

Université de Montréal

**Réparation par excision de nucléotides spécifique au
cycle cellulaire: Implications pour la résistance à la
chimiothérapie dans le cancer de l'ovaire humain**

par

Maxime Dubé

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de M.Sc.

en biologie moléculaire

option générale

Août, 2010

© Maxime Dubé, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Régulation par excision de nucléotides spécifique au cycle cellulaire: Implications pour la
résistance à la chimiothérapie dans le cancer de l'ovaire humain

Présenté par :

Maxime Dubé

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Yves Langelier, président-rapporteur

Dr Elliot A. Drobetsky, directeur de recherche

Dr Gregory Emery, membre du jury

Résumé

Le cancer de l’ovaire est un cancer ayant un taux de décès particulièrement élevé. Les patientes répondent habituellement bien aux traitements chimiothérapeutiques mais la majorité connaîtront une rechute. Plusieurs mécanismes ont été identifiés comme partiellement responsables du développement de la résistance clinique à la chimiothérapie, dont la réparation plus efficace de l’ADN par la réparation par excision de nucléotides (NER). L’un des agents communément utilisés pour traiter ce cancer est le cisplatine, qui induit des dommages à l’ADN réparés par le NER. Une étude précédente de notre laboratoire a démontré qu’une déficience uniquement en phase S de la réparation par le NER peut se produire. Cette déficience est aussi dépendante de la kinase ATR. Nous avons choisi de déterminer si cette déficience est présente dans certains cas de cancer de l’ovaire et si cette déficience joue un rôle sur la résistance à la chimiothérapie. Nos objectifs sont donc : (i) vérifier la présence de cette déficience dans diverses lignées isolées du cancer de l’ovaire ; (ii) vérifier si le traitement chimiothérapeutique par des agents à base de platine peut favoriser la survie de cellules ayant une meilleure capacité de réparation par le NER; (iii) mesurer la sensibilité de ces lignées au cisplatine et vérifier si ceci corrèle avec leur capacité de réparation par le NER en phase S; (iv) déterminer si cette déficience est causée par la kinase ATR dans ces lignées. Nous avons déterminé qu’une déficience importante de la réparation par le GG-NER en phase S est présente dans de nombreuses lignées. De plus, des lignées isolées d’une même patiente pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie montrent une augmentation significative de leur capacité de

réparation par le GG-NER en phase S, suggérant un rôle de ce processus dans la résistance à la chimiothérapie. Nous avons aussi démontré qu'il y a une corrélation entre la capacité de réparation en phase S par le GG-NER et la sensibilité des lignées au cisplatine. Toutefois, nos résultats suggèrent que cette déficience n'est pas causée par ATR dans ces lignées puisque la phosphorylation de H2AX en réponse aux UV est similaire dans toutes les lignées. En plus d'un important apport fondamental, cette étude permettra d'étudier un potentiel mécanisme de résistance aux traitements chimiothérapeutiques dans le cancer de l'ovaire humain.

Mots-clés : NER, cancer, ovaire, phase S, chimiothérapie, cisplatine, UV, MMC.

Abstract

Ovarian cancer is one of the most lethal cancers. Patients usually respond very well to chemotherapy but most will eventually relapse. Many molecular processes have already been shown to influence chemotherapy resistance, including more efficient DNA repair by nucleotide excision repair. One commonly used drug for the treatment of ovarian cancer is cisplatin, a drug inducing lesions on DNA that can be repaired by NER. A previous study in our lab has shown that NER can be deficient specifically in S-phase. This effect is dependent on the kinase ATR. Thus, we chose to explore the possibility that this deficiency has an impact on resistance to cisplatin. Our objectives are: (i) to study the repair profile by NER in S-phase in ovarian cancer cell lines; (ii) to test if chemotherapeutic treatment can modulate nucleotide excision repair in cell lines by selecting cells that repair damage by NER more efficiently; (iii) to measure the sensitivity of these cell lines to cisplatin; (iv) to test if this deficiency can be attributed to ATR signalling. We show in this study that many ovarian cancer cell lines have an important defect in GG-NER specifically in S-phase. Pairs of cell lines that were isolated before and after chemotherapeutic treatment show an increase in their GG-NER efficiency in S-phase, suggesting a role for this enzymatic process in chemotherapy resistance. Also, we have found a correlation between the efficiency of GG-NER in S-phase and the sensitivity to cisplatin in the cell lines used in our study. However, the defect in GG-NER in S-phase in these ovarian cancer cell lines doesn't seem to be due to ATR because the phosphorylation of H2AX in response to UV is equivalent between the different cell lines. This study will have an impact on our

understanding of the fundamental aspects of DNA repair but could also provide insights on a potential novel mechanism of resistance to chemotherapy.

Keywords : NER, cancer, ovarian, S phase, chemotherapy, cisplatin, UV, MMC

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xiii
Introduction	1
Les dommages à l'ADN et leurs conséquences	1
<i>Les divers types de dommage à l'ADN</i>	4
Les mécanismes de réparation de l'ADN.....	6
<i>Le NER</i>	8
Les maladies d'origine génétique causées par une déficience du NER	11
La réponse aux dommages à l'ADN	13
La synthèse translésion	20
La réponse spécifique aux UV	22
Introduction-section 2	24
Le cancer de l'ovaire.....	24
Le traitement du cancer de l'ovaire.....	26
<i>Le taxol</i>	26
<i>Les agents à base de platine</i>	26
La réparation des dommages causés par les agents à base de platine	29
La mitomycine C.....	32
La réparation des ICLs	33
La réparation par le GG-NER spécifique au cycle cellulaire.....	37
Hypothèses et objectifs	39

Matériel et méthodes	40
<i>Culture cellulaire</i>	40
<i>Conditions d'irradiation</i>	40
<i>Détermination de la capacité de réparation des 6-4PPs en fonction du cycle cellulaire</i>	40
<i>Survie clonogénique</i>	42
<i>Détection de γH2AX par immunofluorescence</i>	43
Résultats	45
Préambule.....	45
Hétérogénéité de la capacité de réparation du GG-NER dans les lignées dérivées de cancers de l'ovaire.....	46
Modification de la capacité de réparation par le GG-NER suite aux traitements chimiothérapeutiques	49
Les lignées cellulaires isolées du cancer de l'ovaire ayant une bonne capacité de réparation en phase S sont plus résistantes au cisplatine	51
Les lignées cellulaires isolées du cancer de l'ovaire ayant une bonne capacité de réparation en phase S sont plus résistantes à la MMC	55
Les lignées cellulaires isolées du cancer de l'ovaire ayant une bonne capacité de réparation en phase S sont légèrement plus résistantes aux UVC	59
L'activité de la kinase ATR est similaire dans les diverses lignées du cancer de l'ovaire humain étudiées.....	62
Discussion	64
Rappel du projet	64
Déficiency dans la réparation par le GG-NER en phase S du cycle cellulaire	65
Modification de la capacité de réparation par le GG-NER suite aux traitements chimiothérapeutiques	67
Corrélation entre la capacité de réparation par le GG-NER en phase S et la sensibilité au cisplatine ainsi que la sensibilité aux UVC et à la MMC	69

Induction similaire de γ H2AX dans les différentes lignées cellulaires cancéreuses ovariennes	74
Conclusion	76
Limites de l'étude.....	78
Expériences futures	80
Bibliographie.....	82
Annexe 1	xiiiiv

Liste des tableaux

Tableau I. Corrélation entre la sensibilité au cisplatine et la capacité de réparation par le GG-NER en phase S dans 9 lignées cellulaires ovariennes

Tableau II. Sensibilité à la MMC et capacité de réparation par le GG-NER correspondante en phase S dans 8 lignées cellulaires ovariennes

Tableau III. Sensibilité aux UV de 8 lignées cancéreuses ovariennes et leurs capacités correspondantes de réparation en phase S des 6-4PPs

Liste des figures

Figure 1. Structures moléculaires des deux principaux types de photoproduits induits sur l'ADN par l'irradiation aux rayons UV

Figure 2. Les différentes étapes du NER

Figure 3. Schéma simplifié de la cascade d'activation d'ATR

Figure 4. Structures moléculaires primaires d'agents chimiothérapeutiques à base de platine

Figure 5. Les différents types d'adduits induits par le cisplatine dans la cellule

Figure 6. La réparation des ICLs chez les mammifères

Figure 7. Capacité de réparation hétérogène dans 7 lignées dérivées du cancer de l'ovaire

Figure 8. Une capacité de réparation plus efficace du GG-NER peut être acquise suite à la chimiothérapie

Figure 9. Les lignées cellulaires dérivées du cancer de l'ovaire déficientes en GG-NER en phase S sont relativement plus sensibles au cisplatine

Figure 10. Les lignées cellulaires dérivées du cancer de l'ovaire déficientes en GG-NER en phase S sont en général plus sensibles à la MMC

Figure 11. Les lignées cellulaires dérivées du cancer de l'ovaire déficientes en GG-NER en phase S sont légèrement plus sensibles aux UVC

Figure 12. Les lignées cellulaires dérivées du cancer de l'ovaire montrent toutes une induction de γ H2AX suite à l'irradiation UVC

Liste des sigles et abréviations

53BP1	Tumor suppressor p53-binding protein 1
6-4PPs	6-4 photoproducts
ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C 2
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
ATP	Adénosine tri-phosphate
ATP7B	Copper-transporting P-type adenosine triphosphate
BER	Réparation par excision de base
BRCA	breast-cancer susceptibility gene
BSA	Albumine de sérum bovin
CDK	Kinase cycline dépendante
Cisplatine	cis-diamminedichloroplatinum(II)
CPDs	Dimères cyclobutane-pyrimidine
CS	Syndrome de Cockayne
CS(A-B)	Protéines du syndrome de Cockayne, groupe de complémentation (A-B)
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
DSBs	Bris double brin de l'ADN
EGFR	Récepteur épidermal des facteurs de croissance
FBS	Sérum bovin foetal
GG-NER	NER génomique global
HR	Recombinaison homologue
RAD23B	human homolog of yeast RAD23
IC50	Concentration permettant d'inhiber 50% de la croissance des colonies
ICL	Crosslink interbrin
IR	Rayonnement ionisant
MAPKs	Mitogen-activated protein kinases

MDC1 Mediator of DNA-damage checkpoint 1
MMC Mitomycine C
MMR Mismatch repair
MRN MRE11-RAD50-NBS1 protein complex
NER Réparation par excision de nucléotides
NHEJ Jonction des terminaisons non-homologue
PAF Paraformaldéhyde
PARP-1 Poly(ADP-ribose) polymérase 1
PBS Phosphate-buffered saline
PCNA Proliferating cell nuclear antigen
PIKK phosphoinositide 3-kinase- related protein kinases
ROS Dérivés réactifs de l'oxygène
RPA Replication protein A
SSBs Bris simple brin de l'ADN
TC-NER NER couplé à la transcription
TFIIH Facteur de transcription général IIH
TOPBP1 DNA topoisomerase 2-binding protein 1
TTD trichothiodystrophie
UV Ultraviolet
XP Xeroderma pigmentosum
XP(A-G,V) Xeroderma pigmentosum, groupe de complémentation (A-G,V)
g Microgramme
M Micromolaire

À ma mère, pour son support inconditionnel

Remerciements

Tout d’abord, je tiens à remercier mon superviseur, le Dr Elliot Drobetsky, pour les nombreuses discussions scientifiques, parfois passionnées, ayant permis ultimement de mener ce projet à terme. J’ai toujours trouvé une porte ouverte lorsque j’ai eu des questions, des doutes et parfois des sauts d’humeur, et sa disponibilité a été grandement appréciée.

Je tiens à remercier aussi particulièrement les divers membres du laboratoire qui m’ont accompagné au cours de cette aventure. D’abord Yannick, d’une vivacité d’esprit remarquable, pour les nombreuses discussions qui m’ont éclairé tout au long de mon parcours. Ma compréhension du domaine a été largement influencée par ces discussions. Ensuite, Raphaël, qui m’a épaulé au niveau technique au cours de mes premiers mois dans le laboratoire. J’ai passé de très bons moments avec lui, et sa rapidité à donner un coup de mains à tous lorsque demandé ainsi que ses conseils m’ont été d’un grand secours.

Ensuite, les membres actuels du laboratoire. D’abord Annie, beaucoup plus terre à terre que moi qui suis un peu lunatique. Désolé si mon «léger» désordre ait pu parfois te faire souffrir ☺. Merci pour ton sourire, ta bonne humeur et ta joie de vivre contagieuse qui m’ont réchauffé le cœur dans les moments plus difficiles. Ensuite, le dernier venu, Vincent, que j’ai, je dois bien l’avouer, fait souffrir à l’occasion avec mes blagues enfantines à faire rager un ange. Merci pour ton originalité, pour toujours avoir eu l’oreille attentive lorsque j’évacuais mes frustrations, pour ton implication et pour ton dévouement à tout ce que tu entreprends.

Je ne peux passer ici sous silence l'implication du laboratoire du Dr Anne-Marie Mes-Masson, sans qui ce projet aurait été tout bonnement impossible. Merci donc aux Dr Anne-Marie Mes-Masson et Dr Diane Provencher pour la collection de lignées ovariennes cruciale à ce projet. Merci aussi à Lise Portelance pour sa collaboration fort appréciée.

Merci aussi à tous les chercheurs, étudiants, assistants de recherche et techniciens que j'ai côtoyés durant mon parcours et qui ont tous influencé mon développement comme chercheur et comme individu. Merci aussi au programme de biologie moléculaire pour le soutien financier et à Vivianne Jodoin pour son aide.

Enfin, un merci tout particulier à ma famille proche, dont mes parents, mon frère, mes grands-parents et tous les autres que je ne peux nommer pour des raisons de concision qui ont toujours été mon support le plus fort. Merci tout particulièrement à ma mère, qui m'a toujours supporté dans tous mes projets, du plus concret au plus farfelu, merci.

Voici maintenant le début de la fin; j'espère que le lecteur appréciera.

Introduction

Les dommages à l'ADN et leurs conséquences

Les cellules composant le corps humain sont exposées à de nombreux agents causant des dommages à l'ADN tous les jours (Jackson and Bartek, 2009). De façon générale, le dommage à l'ADN a été associé à plusieurs conditions affectant l'humain, dont le cancer (Hoeijmakers, 2009) et le vieillissement (Kirkwood, 2005; Wilson III, Bohr et al., 2008).

Une caractéristique commune à tous les cancers est l'instabilité génomique (Bartek, Bartkova et al., 2007). Les diverses mutations introduites lorsque le dommage auquel est soumis l'ADN est mal ou pas réparé entraînent de nombreux effets, dont l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ou l'activation anormale d'oncogènes, ce qui peut entraîner à terme le développement de cancers (Hoeijmakers, 2009). On estime qu'une cellule est soumise à l'action de divers agents exogènes ou endogènes qui causent environ 105 lésions sur l'ADN par jour (Lindahl, 1993).

Plusieurs états impliquant un entretien déficient du génome causant un vieillissement précoce ont été identifiés, appelés les syndromes progéroides segmentaux (Schumacher, Garinis et al., 2008). Les souris atteintes de ce syndrome (déficientes en réparation par excision de nucléotides (NER) dans les articles cités) ont une croissance, un métabolisme et une dépense d'énergie réduits alors que leurs défenses face aux agents oxydants sont augmentées. Pourtant, il y a ici un important paradoxe puisque leur durée de

vie se trouve réduite.(van de Ven, Andressoo et al., 2006; Schumacher, van der Pluijm et al., 2008). Cette réponse de l'organisme, qui est probablement une tentative visant à augmenter la longévité de l'organisme en présence d'une quantité importante de dommage à l'ADN aux dépends de la croissance (axe somatotropique), est appelée la réponse de survie (Schumacher, van der Pluijm et al., 2008). Cette réponse serait aussi activée au cours du vieillissement normal ou au cours d'événements entraînant beaucoup de stress à l'organisme, dont la privation de nourriture (Hoeijmakers, 2009).

Parmi les agents causant des dommages à l'ADN, on peut mentionner les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) produits notamment par les réactions chimiques formant la respiration oxydative (Valko, Rhodes et al., 2006). Les ROS ainsi que des dérivés réactifs de l'azote peuvent aussi être produits aux sites d'inflammation par les neutrophiles ou les macrophages (Kawanishi, Hiraku et al., 2006). De nombreux autres agents causent des dommages à l'ADN, dont les rayonnements ionisants (IR) (Ward, 1988). Les rayons ultraviolet (UV) causent aussi de multiples lésions à l'ADN, dont les dimères cyclobutane-pyrimidine (CPDs) et les 6-4 photoproduits (6-4PPs) (Sinha, 2002). Ces lésions entraînent, entre autres, le blocage de la réplication (Naegeli, 1994) et de la transcription de l'ADN (Tornaletti and Hanawalt, 1999). Il est estimé que le nombre de 6-4PPs induit correspond environ à 10% du nombre de celui des CPDs (Mitchell, 1988). Ce taux ne fait par contre par l'unanimité, certains auteurs proposant un taux de 25% (Koehler, Courcelle et al., 1996). Toutefois, les 6-4PPs joueraient un rôle majeur dans la cytotoxicité et la mutagénèse dus aux UV (Mitchell, 1988; McGregor, Chen et al., 1991; Zdzienicka,

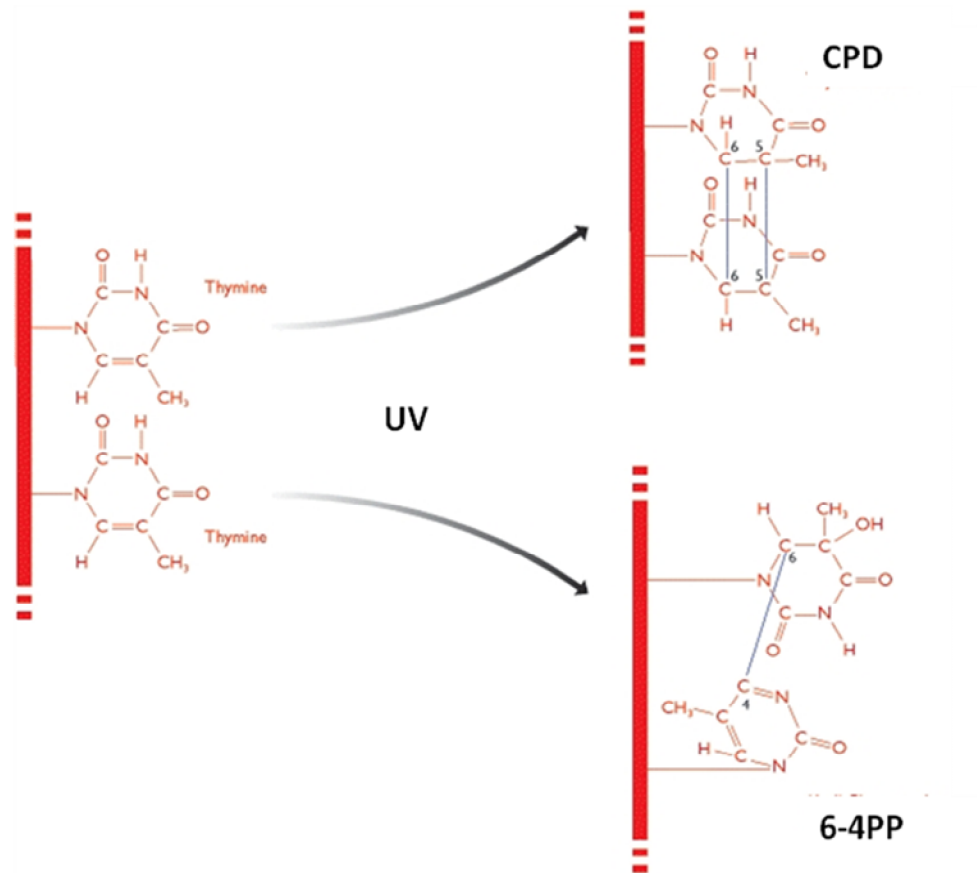


Figure 1. Structures moléculaires des deux principaux types de photoproduits induits sur l'ADN par l'irradiation aux rayons UV
Les 6-4PPs entraînent une déformation plus importante de l'ADN que les CPDs

Adapté de T.A. Brown, *Genomes*, BIOS Scientific Publishers Ltd, 2002.

Venema et al., 1992). Enfin, le nombre de mutations à l'ADN induit par les lésions induites par les UV augmente significativement lorsque la cellule est en phase S (Naegeli, 1994), c'est-à-dire qu'elle réplique son ADN.

La plus grande part des CPDS est créée entre des thymines adjacentes. Toutefois, on retrouve aussi des CPDs liant deux cytidines adjacentes et une thymine et une cytidine adjacentes (Gillet and Schärer, 2005) (voir structure à la figure 1).

Les 6-4PPs sont formés surtout entre deux thymines, deux cytidines ou une cytidine et une thymine et le taux d'induction de ces différents types de 6-4PPs dépend de la

longueur d'onde d'irradiation (Gillet and Schärer, 2005). Il est aussi à noter que les 6-4PPs entraînent, de par leur structure (voir figure 1), une déformation beaucoup plus importante de l'ADN que les CPDs (Kim and Choi, 1995).

Les divers types de dommage à l'ADN

Lorsque l'ADN est endommagé par l'un des agents mentionnés ci-dessus ou un autre, plusieurs types de dommage peuvent être générés. Parmi eux, on retrouve les bris simple brin (SSBs) et les bris double brin (DSBs) (Jackson and Bartek, 2009). Les SSBs sont souvent produits par des dérivés réactifs de l'oxygène qui provoquent la destruction de résidus désoxyribose et qui peuvent aussi causer des dommages aux bases de l'ADN (Lindahl and Wood, 1999). Les DSBs sont par contre les plus cytotoxiques des deux types de dommage mentionnés (Huertas, 2010). Ils sont générés entre autres par l'exposition aux IR (Ohnishi, Mori et al., 2009) et à de multiples agents agissant par la création de radicaux libres, dont la bléomycine ou la tirapazamine (Banáth and Olive, 2003). Les DSBs sont souvent produits lorsque la machinerie de réplication de la cellule entre en contact avec une lésion qui la bloque (Hartlerode and Scully, 2009). Les DSBs peuvent aussi être produits lors de la réparation des SSBs par des mécanismes moléculaires cellulaires, entre autres la réparation par excision de base décrits ci-dessous (Vilenchik and Knudson, 2003). Deux SSBs formés près l'un de l'autre mènent aussi parfois à la formation de DSBs (Jackson and Bartek, 2009). De plus, divers agents causant un type de dommage particulier, les crosslinks (liens covalents entre deux bases de l'ADN), peuvent induire la formation de DSBs. C'est le cas entre autres du cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatine) (Huang,

Okafuji et al., 2004). Enfin, les lésions induites par les UV peuvent causer des DSBs lors de la réparation de ces lésions par le NER (voir plus bas pour description) ou bien lorsque les fourches de réplication bloquées se dégradent (Limoli, Giedzinski et al., 2002). Des CPDs non réparés provoquent en effet le recrutement de protéines souvent associées aux DSBs, dont Rad51, γ H2AX et P53bp1 (Garinis, Mitchell et al., 2005).

Les mécanismes de réparation de l'ADN

Afin de faire face aux divers types de dommage subis par l'ADN, (Gillet and Schärer, 2005) de nombreux mécanismes moléculaires se sont développés au cours de l'évolution. On retrouve parmi ceux-ci la réparation de l'ADN, la synthèse translésion, les points de contrôle du cycle cellulaire, la recombinaison ainsi que la sénescence ou l'apoptose (Sancar, Lindsey-Boltz et al., 2004).

Afin de simplifier leur classification, les mécanismes de réparation de l'ADN peuvent être regroupés en cinq catégories majeures, soit la réparation par excision de base (BER), le renversement direct du dommage, le mismatch repair (MMR), la réparation des DSBs et la réparation par excision de nucléotides (NER) (Lindahl and Wood, 1999; Schärer, 2003).

Le BER est le mécanisme préférentiel utilisé pour réparer les SSBs mentionnés plus haut et, plus généralement, le BER est utilisé pour remplacer des bases endommagées par exemple par l'oxydation (Lindahl and Wood, 1999). Ceci est effectué grâce à des glycosylases de l'ADN (Cunningham, 1997). La polymérase PARP-1 jouerait aussi un rôle essentiel dans la réparation des SSBs par le BER. Cette polymérase utilise le NAD⁺ comme substrat pour générer des chaînes de poly(ADP-ribosyl) sur diverses protéines, dont elle-même (Amé, Spencehauer et al., 2004). La forme ainsi auto-activée de PARP-1 peut interagir avec plusieurs protéines, par exemple la protéine XRCC1, protéine d'importance majeure du BER (Masson, Niedergang et al., 1998; Taylor, Thistlethwaite et al., 2002).

PARP-1 recruterait XRCC1 aux sites de SSBs et autres lésions reconnues par celle-ci, entraînant la cascade de réparation par le BER (El-Khamisy, Masutani et al., 2003; Okano, Lan et al., 2003).

Chez l'humain, le seul mécanisme de renversement direct du dommage élucidé à ce jour est la réparation des O⁶-méthylguanine à l'aide d'une méthyltransférase (Moore, Gulbis et al., 1994).

Le MMR permet de corriger les erreurs de mésappariement introduites par les polymérases lors de la réplication (Buermeyer, Deschênes et al., 1999; Hoeijmakers, 2001). Le mésappariement est détecté par la protéine dimérique MutS (Sixma, 2001). MutL est ensuite recruté, ce qui active MutH qui peut cliver le brin fille afin de permettre son excision puis la synthèse d'un nouveau brin (Buermeyer, Deschênes et al., 1999).

La réparation des DSBs est réalisée par deux mécanismes principaux distincts, soit la recombinaison homologue (HR) et la jonction non-homologue des terminaisons (NHEJ) (Hartlerode and Scully, 2009). La HR permet une réparation usuellement sans erreur mais nécessite la présence d'un modèle d'ADN intact et elle permet aussi la résolution des fourches de réplication endommagées (Sung and Klein, 2006). La HR est médiée entre autres par BRCA1 (Yun and Hiom, 2009) ainsi que BRCA2 en association avec la recombinase Rad51 (Wong, Pero et al., 1997; Pellegrini, Yu et al., 2002; San, Chi et al., 2006). Quant à la reconnaissance des DSBs, elle serait effectuée par le complexe Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) lié à Rad50 qui joindraient les deux extrémités de l'ADN endommagé (Hopfner, Craig et al., 2002; Williams, Moncalian et al., 2008). MRN jouerait aussi un rôle

similaire dans le NHEJ (Rass, Grabarz et al., 2009; Xie, Kwok et al., 2009). Le NHEJ est un mécanisme de réparation des DSBs souvent mutagénique qui ne nécessite pas de modèle d'ADN intact (Lieber, Ma et al., 2003). Ce mécanisme est régulé entre autres par la kinase DNA-PKcs (Yaneva, Kowalewski et al., 1997). DNA-PKcs est recruté par l'hétérodimère Ku70/Ku80 au site du DSB (Yaneva, Kowalewski et al., 1997). DNA-PKcs peut ensuite préparer la lésion pour les étapes subséquentes en association avec la protéine Artemis (Yunmei, Pannicke et al., 2002). Enfin, le NER agit sur une variété de lésions causant une distorsion de l'hélice d'ADN (Gillet and Schärer, 2005).

Le NER

Il existe deux mécanismes distincts de réparation par le NER, soit le NER couplé à la transcription (TC-NER) qui répare préférentiellement les lésions induites sur des gènes transcrits afin d'empêcher le blocage de l'ARN polymérase II (Svejstrup, 2002), et le NER génomique global (GG-NER) qui répare les lésions sur l'ensemble du génome (Mellon, Spivak et al., 1987; van Hoffen, Venema et al., 1995). Le NER répare entre autres les lésions induites par les UV, soit les CPDs et les 6-4PPs, et répare plus rapidement les 6-4PPs que les CPDs (Mitchell, 1988). La cinétique de réparation de ces deux photoproduits est toutefois modifiée en fonction de la dose de UV appliquée (Koehler, Courcelle et al., 1996).

Le GG-NER (voir figure 2) est un mécanisme de réparation se produisant de façon séquentielle, c'est-à-dire que les différentes protéines nécessaires à son déroulement se lient au site du dommage dans un ordre établi. De nombreuses protéines sont impliquées dans le

GG-NER, entre autres les protéines *xeroderma pigmentosum* (XP). Cela débute par la reconnaissance de la lésion par le complexe protéique XPC-Rad23B (Riedl, Hanaoka et al., 2003; Tapias, Auriol et al., 2004). Le facteur de transcription général IIIH (TFIIH) est ensuite recruté au site de la lésion par XPC-Rad23B (Yokoi, Masutani et al., 2000). Deux sous-unités hélicase de TFIIH, XPB et XPD, peuvent dérouler le brin d'ADN à l'aide d'une réaction ATP-dépendante aux alentours de la lésion, soit 30 paires de base dans chaque direction (Evans, Fellows et al., 1997; Evans, Moggs et al., 1997; Saldivar, Wu et al., 2007). L'ADN simple brin créé au cours de ce processus est stabilisé par la protéine de réplication A (RPA) (de Laat, Appeldoorn et al., 1998). Le complexe XPA-RPA, quant à lui, est responsable du recrutement de plusieurs facteurs formant le complexe de pré-incision et XPA stabiliserait la liaison de RPA avec l'ADN tout en assurant l'intégrité de la structure double-brin (Patrick and Turchi, 2002). Il a aussi été démontré que le recrutement de XPA à une lésion ne peut être effectué sans la présence préalable de XPC (Volker, 2001). Une autre protéine d'importance majeure présente dans le complexe de pré-incision est XPG (Volker, 2001; Riedl, Hanaoka et al., 2003). De plus, le recrutement de XPA-RPA est, lui, nécessaire au recrutement de, entre autres, l'endonucléase ERCC1-XPF (Volker, 2001). ERCC1-XPF peut ensuite cliver le brin endommagé en 5' alors que XPG peut le cliver en 3', les deux réactions se produisant presque simultanément (Matsunaga, Mu et al., 1995; Moggs, Yarema et al., 1996). La synthèse d'un nouveau brin et la ligation de celui-ci sont ensuite réalisés comme lors de la réplication et nécessitent PCNA (Aboussekhra and Wood, 1995), RPA (Coverley, Kenny et al., 1991) et les polymérases delta (Zeng, 1994) ou epsilon (Shivji, Podust et al., 1995). La DNA ligase 1 peut ensuite lier le brin

nouvellement synthétisé à l'aide des différents facteurs mentionnés pour compléter la réaction (Araújo, Tirode et al., 2000).

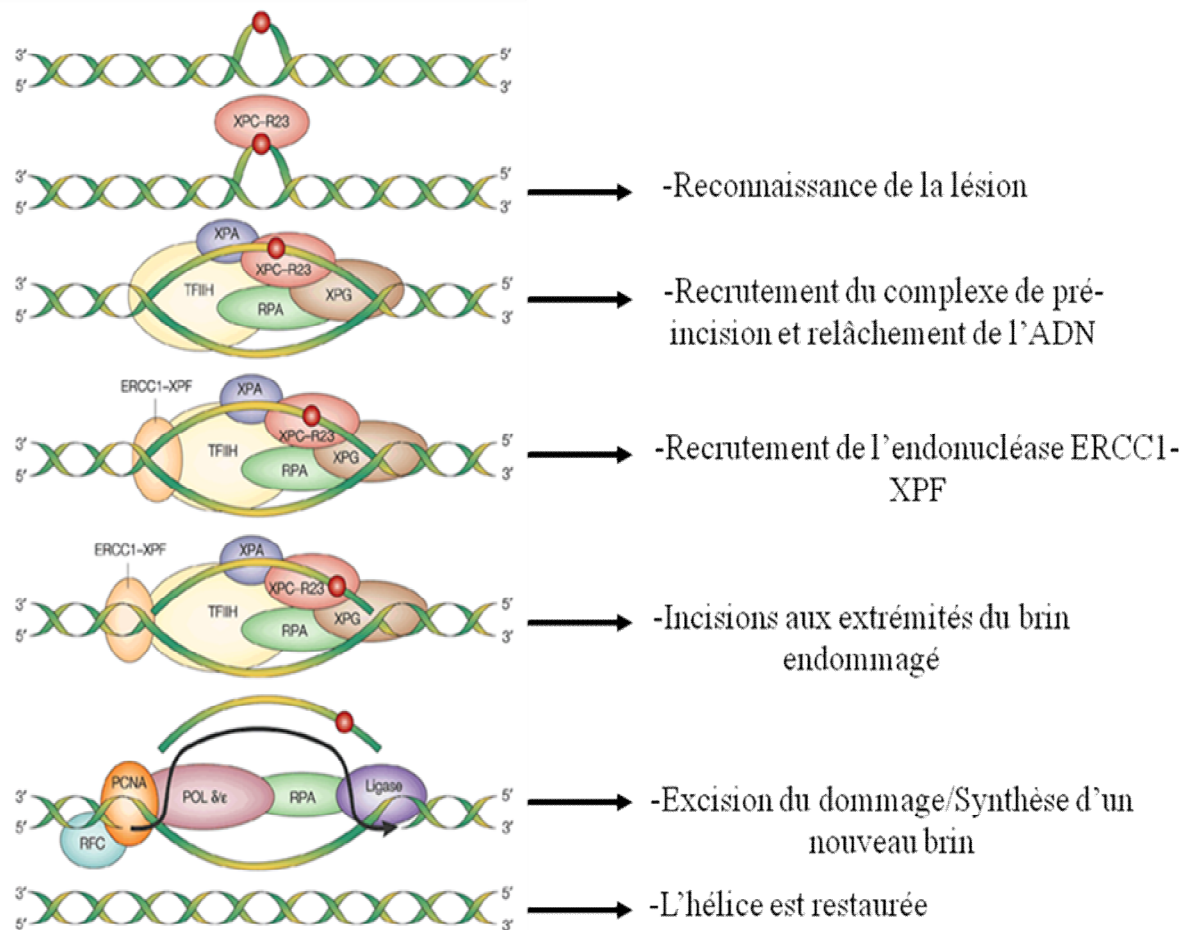


Figure 2. Les différentes étapes du NER

Le NER est un mécanisme de réparation de l'ADN se déroulant séquentiellement

Adapté de Friedberg, E.C., Nat Rev Cancer, 2001. 1(1): p. 22-33.

Les maladies d'origine génétique causées par une déficience du NER

Certaines maladies ayant pour origine un défaut dans la réparation des dommages à l'ADN par le NER ont été identifiées, dont Xeroderma pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et la trichothiodystrophie (TTD) (Cleaver, Lam et al., 2009).

Xeroderma pigmentosum est une maladie d'origine génétique causée par un défaut dans la réparation de l'ADN (Cleaver, 1968). Elle comprend plusieurs groupes de complémentation, chacun correspondant à une protéine mutée différente et entraînant un défaut dans l'efficacité du NER (Hoeijmakers, 2001; Cleaver, 2005). Parmi ceux-ci, notons XPA, XPC, XPV (polymérase η), XPE, XPB, XPD, XPG et XPF (Cleaver, 2005). Les patients ont une sensibilité accrue au soleil. De plus, ils ont 1000 fois plus de risques de développer un cancer de la peau que la population générale (Gillet and Schärer, 2005).

Les patients atteints de CS ont une déficience en TC-NER uniquement (Svejstrup, 2002). Ils ont une sensibilité importante aux rayons UV (Andrews, Barrett et al., 1978) mais, contrairement aux patients atteints de XP, ont un taux de maladies neurodégénératives supérieur à la normale mais peu de cas de cancer (Cleaver, 2005). Ces patients expriment une forme déficiente de l'une des deux protéines suivantes de la réparation par excision de nucléotides couplée à la transcription : syndrome de Cockayne groupe de complémentation A (CSA) ou syndrome de Cockayne groupe de complémentation B (CSB). Celles-ci sont impliquées uniquement dans la TC-NER, et sont

donc incapables de réparer les lésions dans les brins d'ADN transcrits (Venema, Mullenders et al., 1990; van Hoffen, Natarajan et al., 1993).

Quant à la TTD, il s'agit d'un groupe de maladies d'origine génétique ayant des effets plus ou moins importants selon les cas, dont des cheveux cassants déficients en soufre et quantité d'autres symptômes présents chez certains patients dont des retards dans la croissance et dans le développement mental, une sensibilité de la peau à la lumière, des infections récurrentes et de la microcéphalie (Stefanini, Botta et al., 2010). Les patients atteints de TTD photosensible ont des mutations dans les protéines XPB, XPD ou p8/TTDA qui sont des sous-unités de TFIIH (Stefanini, Botta et al., 2010). Une possible explication de la variété importante des symptômes d'un individu à l'autre est que différentes mutations causeraient des impacts plus ou moins importants sur la stabilité et la conformation de TFIIH. Les effets sur la fonction de TFIIH changeraient donc d'individu en individu selon la mutation spécifique (Lehmann, 2001).

La réponse aux dommages à l'ADN

La cellule possède de nombreux mécanismes moléculaires lui permettant de signaler le déploiement de ses défenses contre le dommage à l'ADN. Deux protéines-clé sont les kinases ATR et ATM, de la famille des phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases (PIKK) (Shiloh, 2003). La première est recrutée et activée surtout par l'ADN simple-brin lié à la protéine RPA (Zou and Elledge, 2003; Cimprich and Cortez, 2008) alors que la deuxième l'est surtout par les DSBs (Shiloh, 2003). Entre 0,5 et 1,0% de la population porte une mutation hétérozygote dans la protéine ATM qui prédispose au développement du cancer, les cas plus graves (homozygote) ayant une condition nommée ataxia-telangiectasia (Swift, Reitnauer et al., 1987; Renwick, Thompson et al., 2006). Un syndrome rare, le syndrome de Seckel, est quant à lui causé par une mutation réduisant l'expression d'ATR. Ceci provoque de la microcéphalie et un retard de croissance (O'Driscoll, Ruiz-Perez et al., 2003).

ATR est nécessaire à la viabilité de la cellule (Brown and Baltimore, 2000). De plus, elle agit à l'aide de la protéine ATRIP avec laquelle elle interagit et qu'elle phosphoryle. (Cortez, Guntuku et al., 2001). Ces deux protéines régulent leur expression respective (ATR régule l'expression de ATRIP et vice-versa) (Cortez, Guntuku et al., 2001). Comme mentionné précédemment, ATR est activée par l'ADN simple brin lié à RPA qui est formé entre autres lors de la réplication et lors de la réparation de l'ADN (voir figure 3) (Fanning, Klimovich et al., 2006). ATRIP serait responsable de l'interaction avec

RPA (Zou and Elledge, 2003). ATR est aussi activée par la protéine TopBP1 (Choi, Lindsey-Boltz et al., 2009) et par les lésions elles-mêmes (Ünsal-Kaçmaz, Makhov et al., 2002; Choi, Lindsey-Boltz et al., 2007). ATR est toujours active en phase S et joue un rôle important dans la régulation de la réplication (Shechter, Costanzo et al., 2004) et dans la détection du stress réplcatif (Cimprich and Cortez, 2008). Ceci est illustré par la formation de foci d'ATR aux sites de fourches de réplication bloquées (Tibbetts, Cortez et al., 2000).

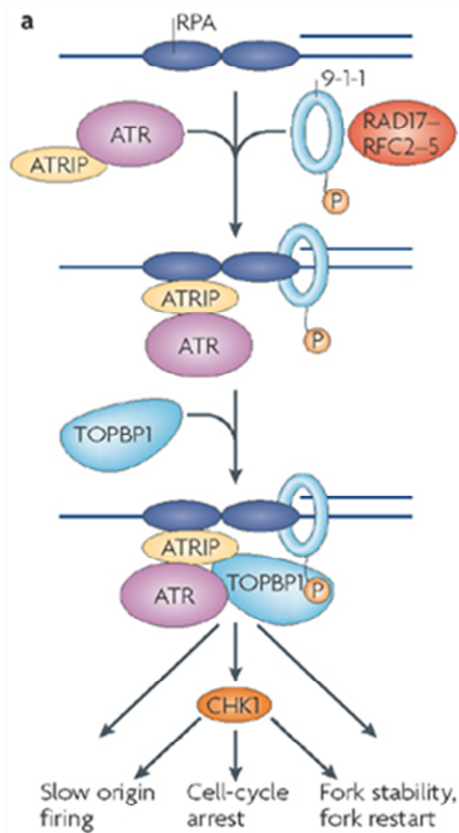


Figure 3. Schéma simplifié de la cascade d'activation d'ATR. La kinase ATR est activée par RPA lié à l'ADN simple brin et peut ensuite phosphoryler, entre autres, Chk1

Source: Cimprich, KA et al. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9, p 616-627

La kinase ATR phosphoryle de nombreuses protéines, dont Chk1. Cette dernière est activée suite à la phosphorylation par ATR des Ser317 et Ser345 (Liu, Guntuku et al., 2000; Matsuoka, Ballif et al., 2007; Smolka, Albuquerque et al., 2007). L'activation de la kinase Chk1 provoque sa libération de la chromatine (Smits, Reaper et al., 2006). Parmi les substrats majeurs de Chk1 sont les phosphatases Cdc25 qui vont être inactivées, empêchant l'activation des CDK ce qui va provoquer l'arrêt du cycle cellulaire (Furnari, Rhind et al., 1997; Sanchez, Wong et al., 1997).

Trois points de contrôle du cycle cellulaire sont connus, soit le point de contrôle G1/S,

contrôlant l'entrée de la cellule en réplication, le point de contrôle intra-S et le point de contrôle G2/M, contrôlant l'entrée de la cellule en mitose (Abraham, 2001; Harper and Elledge, 2007). Ces points de contrôle permettent de maintenir l'intégrité du génome en bloquant le déroulement normal du cycle cellulaire lorsque du dommage à l'ADN ou une réplication incomplète sont détectés par la cellule (Reinhardt and Yaffe, 2009). Ces points de contrôle sont régulés par les kinases ATR et ATM, ATR surtout via Chk1 et ATM surtout via Chk2 (Bartek and Lukas, 2003).

Chk1 est essentiel à la survie chez la souris (Liu, Guntuku et al., 2000). Chk1 serait surtout activé par ATR en réponse au stress réplicatif et aux UV (Feijoo, Hall-Jackson et al., 2001; Zhao and Piwnica-Worms, 2001). Il existe trois membres connus de la famille des phosphatases Cdc25 (Reinhardt and Yaffe, 2009) et l'une d'elles, Cdc25-A, serait critique pour la régulation du point de contrôle intra-S par Chk1 (Jin, Shirogane et al., 2003). L'inactivation de Cdc25-A bloque l'activation de Cdk2 qui normalement favorise l'arrimage de Cdc45 sur la chromatine, bloquant ainsi le cycle cellulaire (Arata, Fujita et al., 2000). En plus du point de contrôle intra-S, Chk1 régule aussi le point de contrôle G2/M, toujours sous contrôle d'ATR (Liu, Guntuku et al., 2000). Chk1 régulerait aussi le point de contrôle G2/M en réponse aux IR sous contrôle d'ATM (Gatei, Sloper et al., 2003).

Généralement, Chk2 est activé par les DSBs et phosphorylé par ATM pour réguler le cycle cellulaire (Bartek, Falck et al., 2001; Lee and Chung, 2001). Tout comme Chk1, Chk2 phosphoryle Cdc25-A mais en Ser123 plutôt qu'en Ser75 (Hasepass, Voit et al.,

2003). L'activation de Cdc25-A par Chk2 est observé après exposition aux IR mais pas aux UV, contrairement à Chk1 (Hasepass, Voit et al., 2003). Enfin, autant Chk1 que Chk2 phosphorylent p53, un suppresseur de tumeurs régulant entre autres le point de contrôle G1/S (Chehab, Malikzay et al., 2000; Hirao, Kong et al., 2000; Shieh, Ahn et al., 2000).

De nombreuses autres protéines ont un rôle dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire. Entre autres, la protéine liant le suppresseur de tumeurs p53 1 (53BP1) (DiTullio, Mochan et al., 2002; Wang, Matsuoka et al., 2002), la protéine médiatrice du point de contrôle du dommage à l'ADN 1 (MDC1) (Stewart, Wang et al., 2003) et la protéine cancer du sein 1 (BRCA1) (Wang, Cortez et al., 2000) y joueraient un rôle.

Parmi les autres substrats d'ATR, il y a entre autres BRCA1 (Tibbetts, Cortez et al., 2000), la protéine du syndrome de Bloom (BLM) (Davies, North et al., 2004) et l'hélicase ATP-dépendante du syndrome de Werner (WRN) (Pichierri, Rosselli et al., 2003). Ces protéines étant impliquées dans la résolution des fourches bloquées, ceci suggère un rôle pour ATR dans la recombinaison lorsque les fourches de réplication sont bloquées (Cimprich and Cortez, 2008). Une autre protéine-clé phosphorylée par ATR est XPA qui migre vers le noyau suite à cette modification (Wu, Shell et al., 2006). Enfin, ATR phosphoryle FANCD2 (Andreassen, D'Andrea et al., 2004), une protéine de la cascade protéique de l'anémie de Fanconi, cascade qui jouerait un rôle entre autres dans la réparation des crosslinks interbrins (Shen, Do et al., 2009), c'est-à-dire entre deux brins d'ADN différents .

La protéine suppresseur de tumeurs p53 est activée par diverses kinases, dont ATM, ATR, DNA-PK, Chk1 et Chk2 (Appella and Anderson, 2001). Des mutations dans p53 ont été détectées dans la majorité des types de cancers humains (Hollstein, Rice et al., 1994). Ce suppresseur de tumeurs a été impliqué dans un nombre important de mécanismes moléculaires, dont le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation, la réparation de l'ADN, la sénescence et l'angiogénèse (Vogelstein, Lane et al., 2000; Vousden and Lu, 2002; Hofseth, Hussain et al., 2004; Meek, 2004). Plus spécifiquement, p53 a été identifié comme facilitant le NER et le BER (Offer, Wolkowicz et al., 1999; Adimoolam and Ford, 2003). L'activation de p53 est effectuée par différents stimuli, dont le dommage à l'ADN (Meek, 1999; Carr, 2000) et des signaux de croissance anormaux, induits entre autres par des oncogènes (Sherr and Weber, 2000). L'activation de p53 se déroule en inhibant son interaction avec l'oncogène MDM2, qui cible p53 au protéasome (Momand, Wu et al., 2000). Plusieurs kinases modifieraient la structure de p53 en réponse au dommage à l'ADN afin d'inhiber cette interaction, dont Chk1, Chk2, ATR, DNA-PK ou ATM (Giaccia and Kastan, 1998; Meek, 1999).

Une fois activée, p53 active le point de contrôle G1/S du cycle cellulaire en stimulant l'expression de p21, qui est un inhibiteur des CDKs (Brugarolas, Chandrasekaran et al., 1995). Le suppresseur de tumeurs p53 joue aussi un rôle (selon certaines études) dans le contrôle du point de contrôle G2/M en inhibant Cdc25-C (St. Clair and Manfredi, 2006) et en activant 14-3-3 σ (Hermeking, Lengauer et al., 1997). Comme mentionné précédemment, la famille des Cdc25 sont des phosphatases activant les CDKs essentielles

au cycle cellulaire. Les Cdc25 inactivées empêchent donc l'action de Cdc2/CyclinB et la poursuite du cycle cellulaire vers la mitose (Houtgraaf, Versmissen et al., 2006).

Un autre rôle important de p53 dans le contexte de cette étude est que celui-ci est nécessaire à la réparation par le GG-NER des CPDs de façon efficace (Ford and Hanawalt, 1995; Mathonnet, Léger et al., 2003; Auclair, Rouget et al., 2008). Par contre, p53 ne joue aucun rôle dans la réparation des 6-4PPs (Auclair, Rouget et al., 2008).

H2AX, une histone modifiée, peut être phosphorylée sur le résidu Ser-139 (Huang, Okafuji et al., 2004), en réponse entre autres au stress réplcatif induit par de nombreux agents, dont l'aphidicoline (Hammond, Green et al., 2003), les UV (Ward and Chen, 2001), l'hydroxyurée (Hammond, Green et al., 2003; Liu, Kuo et al., 2003) et le cisplatine.(Huang, Okafuji et al., 2004). On retrouve la forme phosphorylée de H2AX aux sites de bris de l'ADN. En réponse aux UV, cette phosphorylation est dépendante uniquement de l'action de la kinase ATR (Ward and Chen, 2001; Hanasoge and Ljungman, 2007) ou surtout de celle d'ATM (de Feraudy, Revet et al., 2010), selon les études. De plus, cette phosphorylation est réalisée de façon beaucoup plus importante en phase S du cycle cellulaire après irradiation par les UV (Ward, Minn et al., 2004; de Feraudy, Revet et al., 2010). Cette phosphorylation serait réalisée en réponse surtout aux DSBs, aux structures intermédiaires causées par la réparation de l'ADN ou bien aux fourches réplcatives bloquées (Ward and Chen, 2001; Hammond, Green et al., 2003; Hanasoge and Ljungman, 2007; Ohnishi, Mori et al., 2009; de Feraudy, Revet et al., 2010). De façon générale, les études ayant étudié l'induction de la phosphorylation de H2AX durant les deux premières

heures post-traitement aux UV montrent que cette phosphorylation est dépendante de ATR (Ward and Chen, 2001; Hanasoge and Ljungman, 2007). Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire appuient aussi cette conclusion (Rajotte and Drobetsky, résultats non publiés). Ceci est aussi cohérent avec l'observation que les DSBs, qui sont l'agent principal stimulant l'action d'ATM (Shiloh, 2003), n'apparaissent en nombre important pour être observés expérimentalement que 16h après irradiation aux UV (Garinis, Mitchell et al., 2005).

La synthèse translésion

La synthèse translésion n'est pas un mode de réparation de l'ADN mais plutôt une forme de tolérance à ce dommage (Friedberg, 2005). Ceci est effectué à l'aide de polymérases qui peuvent répliquer l'ADN malgré les lésions (translésions) mais avec une faible fidélité quant à la séquence de l'ADN répliquée (Prakash, Johnson et al., 2005). Cela peut être expliqué par le fait que ces polymérases n'ont pas de fonction exonucléase qui permet aux polymérases répliquatives à haute fidélité de vérifier puis corriger les erreurs induites lors de la réplication (Kunkel, Pavlov et al., 2003).

Les polymérases translésion les plus étudiées sont membres de la famille-Y, soit, entre autres, la polymérase ι , la polymérase η , la polymérase κ et REV1 (Prakash, Johnson et al., 2005).

Le mécanisme de la synthèse translésion a comme point central le changement de polymérase aux sites de blocage de la réplication (Friedberg, Lehmann et al., 2005). Ceci peut se produire suite à l'utilisation d'une multitude d'agents, dont les UV, le cisplatine et la mitomycine C (Kannouche, Wing et al., 2004; Solomon, Cardoso et al., 2004; Lehmann, Niimi et al., 2007). Lorsque la fourche de réplication rencontre des lésions sur l'ADN, PCNA est monoubiquitinée par Rad18 (une ubiquitine-ligase E3 impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN) (Kannouche, Wing et al., 2004; Watanabe, Tateishi et al., 2004). Cette modification post-traductionnelle permet d'augmenter l'affinité de PCNA pour les polymérases translésion (Bienko, Green et al., 2005). La localisation des

polymérase η aux sites de réplication bloquée pourra se faire aux dépens des polymérase répliquatives (Plosky, Vidal et al., 2006; Guo, Kosarek-Stancel et al., 2009).

La polymérase η est requise pour effectuer la synthèse translésion lorsque la fourche de réplication est bloquée par des CPDs (Johnson, Prakash et al., 1999). Elle peut aussi répliquer l'ADN en présence de lésions induites par le cisplatine (Vaisman, Masutani et al., 2000; Bassett, King et al., 2004).

Enfin, la polymérase η est mutée dans la maladie d'origine génétique Xeroderma pigmentosum, groupe de complémentation V. Cette maladie entraîne une haute sensibilité à l'exposition au soleil et une prédisposition au cancer de la peau (Cleaver, 1972). Ceci pourrait être expliqué par le fait que si des mutations rendent la polymérase η inefficace, la polymérase ι pourrait devoir effectuer la réplication translésion lorsque des CPDs bloquent la fourche de réplication. Or, la polymérase ι induit relativement plus de mutations que la polymérase η (Wang, Woodgate et al., 2007).

La réponse spécifique aux UV

Ce survol de la réponse générale aux dommages à l'ADN étant effectué, il est impératif de décrire plus précisément la réponse aux UV, sujet de cette étude. Les UVC (254 nm) sont couramment utilisés comme modèle puisque, même s'ils sont absorbés par la couche d'ozone (Madronich, 1993), ils entraînent plus de dommages à l'ADN par rapport aux UVA ou aux UVB pour une même dose (Freeman, Hacham et al., 1989) tout en déclenchant dans la cellule des réactions similaires à celles induites par les UVB (Bender, Blattner et al., 1997). De plus, l'irradiation de cellules à 30 J/m^2 d'UVC entraîne approximativement le même nombre de lésions qu'une exposition au soleil de 2 heures (Klocker, Auer et al., 1984).

Les UV activent une réponse cellulaire via une réponse dépendante des dommages à l'ADN (impliquant entre autres la réponse d'ATR, décrite ci-dessus) et une réponse indépendante de ces dommages. La réponse indépendante de ces dommages est initiée par l'auto-phosphorylation des récepteurs des facteurs de croissance (EGFR) (Coffer, Burgering et al., 1995). Ceci provoque l'activation d'une réponse cellulaire via entre autres Src et la cascade Ras-Raf-MEK-MAPK (Coffer, Burgering et al., 1995; Rosette and Karin, 1996). Enfin, ces événements mènent à une expression plus élevée de facteurs de transcription associés à la croissance, la différenciation et la défense contre le dommage cellulaire, dont c-Fos et c-Jun (Buscher, Rahmsdorf et al., 1988; Devary, Gottlieb et al.,

1991). Cependant, les MAPKs ne réguleraient pas la réparation des dommages induits par les UV par le GG-NER (Rouget, Auclair et al., 2008).

La réponse aux UV dépendante des dommages à l'ADN permet d'activer divers processus cellulaires, dont la réparation des dommages, l'arrêt du cycle cellulaire ou encore l'apoptose. Quant à la réponse indépendante des dommages à l'ADN, en plus de l'activation de facteurs impliqués entre autres dans la protection contre le dommage cellulaire (c-Fos et c-Jun) elle est aussi impliquée dans la stimulation de NFkappaB et donc dans le contrôle, entre autres, de l'apoptose (Bender, Gottlicher et al., 1998).

Introduction-section 2

Le cancer de l’ovaire

Le cancer de l’ovaire a causé la mort de 15520 femmes aux États-Unis en 2008 (Jemal, Siegel et al., 2008). Ce cancer est difficile à détecter puisque ses symptômes sont non-spécifiques; 70% des diagnostics de cancer de l’ovaire ne sont réalisés que lorsque le cancer a déjà atteint les stades III ou IV, c’est-à-dire qu’il a déjà produit des métastases (Permuth-Wey and Sellers, 2009). Environ 90% des cancers de l’ovaire (malins) sont d’origine épithéliale et de ceux-ci 75-80% sont séreux, 10% sont mucineux, 10% sont endométrioides et le reste sont des types moins communs, dont les carcinomes à cellules claires (Scully, Young et al., 1998; Holschneider and Berek, 2000). On suppose qu’une cellule épithéliale ovarienne normale a le potentiel de se différencier en ces quatre sous-types histologiques (Auersperg, Wong et al., 2001). Au cours du développement du cancer, les cellules épithéliales ovariennes vont développer des caractéristiques similaires à celles des épithélia dérivés des canaux de Muller, soit l’oviducte, l’endomètre et le col utérin (Auersperg, Wong et al., 2001). Les carcinomes séreux sont des cancers présentant des caractéristiques semblables à l’épithélium des trompes de Fallope, les mucineux avec celui du canal endocervical, les endométrioides avec celui du tissu endométrial (tissu tapissant l’intérieur de l’utérus) et ceux à cellules claires du mésonéphros (Auersperg, Wong et al., 2001; Chen, Ruiz et al., 2003). Le taux de survie des femmes atteintes de carcinomes endométrioides est, parmi les histotypes mentionnés, généralement considéré comme le

plus élevé alors que le taux de survie des carcinomes à cellules claires le plus bas (Chen, Ruiz et al., 2003). 80% à 90% des cas de cancer de l'ovaire se produisent après l'âge de 40 ans et moins de 1% des cancers de l'ovaire épithéliaux se développent avant l'âge de 20 ans (Yancik, 1993).

Le facteur de risque le plus important prédisposant une femme à développer le cancer de l'ovaire est une histoire de cancer de l'ovaire familial (Holschneider and Berek, 2000). La majorité des cancers de l'ovaire héréditaire sont liés à des mutations dans les gènes BRCA1 ou BRCA2 (Szabo and King, 1997; Frank, Manley et al., 1998). De nombreuses mutations dans des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs ont été détectées dans le cancer de l'ovaire, favorisant les cellules cancéreuses en modifiant entre autres la prolifération, la survie et la différenciation de ces cellules (Frohling and Dohner, 2008). Parmi celles-ci, quelques-unes des plus notables se retrouvent dans TP53 (62% des cas de cancer), PTEN, BRAF, KRAS, APC, EGFR et MYC. L'inactivation de BRCA1 et/ou BRCA2 par une perte de l'hétérozygote sur les régions chromosomiques 17p13 et 17q21 (plus de 50% des cas de cancer) est aussi fréquente (Despierre, Lambrechts et al., 2010).

Le traitement du cancer de l’ovaire

Le cancer de l’ovaire est habituellement traité par une combinaison entre la chirurgie et la chimiothérapie avec du paclitaxel et du carboplatine. La combinaison de ces traitements procure une médiane de survie de 3 à 4 ans (Ozols, 2005). Plus de 75% des patientes montrent une réponse clinique complète après une réduction chirurgicale et six cycles de traitement au paclitaxel et au carboplatine (Agarwal and Kaye, 2003). Toutefois, la majorité vont connaître une rechute et éventuellement en mourir (Ozols, 2005).

Le taxol

Le paclitaxel, aussi nommé taxol, agit comme inhibiteur mitotique surtout en stabilisant les microtubules, empêchant donc leur dépolymérisation et la mitose (Schiff, Fant et al., 1979). Les microtubules stabilisés ne peuvent produire des fuseaux mitotiques normaux et donc les cellules cancéreuses ne peuvent se diviser et entrent en apoptose (Jordan, Wendell et al., 1996).

Les agents à base de platine

Le carboplatine est un analogue de seconde génération du cisplatine (voir figure 4) et les deux composés ont une résistance croisée et causent les mêmes lésions (Cara and Dolan, 2007). Ils sont utilisés pour le traitement du cancer de l'ovaire mais aussi pour le traitement du cancer du poumon, de la vessie, des testicules ou de la tête et du cou (Socinski, 2004).

Afin de simplifier la description, seul le cisplatine sera décrit plus bas, sauf mention contraire. Lors de son entrée dans la cellule, le cisplatine est hydraté et perd ses atomes de chlore qui sont remplacés par des molécules d'eau (El-Khateeb, Appleton et al., 1999). Il peut ensuite interagir avec des sites nucléophiles sur l'ADN, entre autres avec les sites

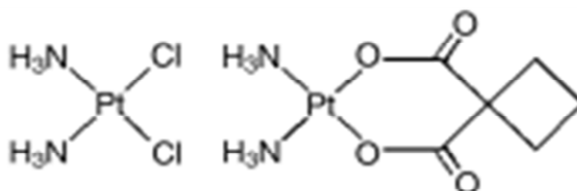


Figure 4. Structures moléculaires primaires d'agents chimiothérapeutiques à base de platine
Ces dérivés sont utilisés dans le traitement du cancer de l'ovaire. À gauche, le cisplatine, à droite, le carboplatine.

Source: Zorbas et al., ChemBioChem 6(7), 2005, pp.1157-1166

N7 des purines pour former des liens covalents entre deux purines du même brin (crosslink intrabrin) ou de deux brins différents (crosslink interbrin) (Eastman, 1987). La majorité des crosslinks générés sont des intrabrins, et les crosslinks 1,2 intrabrin ApG et GpG comptent pour jusqu'à 90% des crosslinks induits (voir figure 5 pour les divers adduits induits par le cisplatine) (Kelland, 1993). Tous les types de crosslinks provoquent une torsion dans l'ADN (Fuertes, Alonso et al., 2003) et un blocage de la réplication (Sorenson and Eastman, 1988). Si la dose est suffisante, ceci peut provoquer la mort de la cellule par apoptose (Ormerod, O'Neill et al., 1994).

Il existe deux écoles de pensée quant à la cytotoxicité du cisplatine. Certains croient que les crosslinks intrabrins, plus nombreux, sont le principal agent cytotoxique, alors que

d'autres supposent que ce sont les crosslinks interbrins, qui induisent une plus importante déformation de l'hélice d'ADN (Cara and Dolan, 2007).

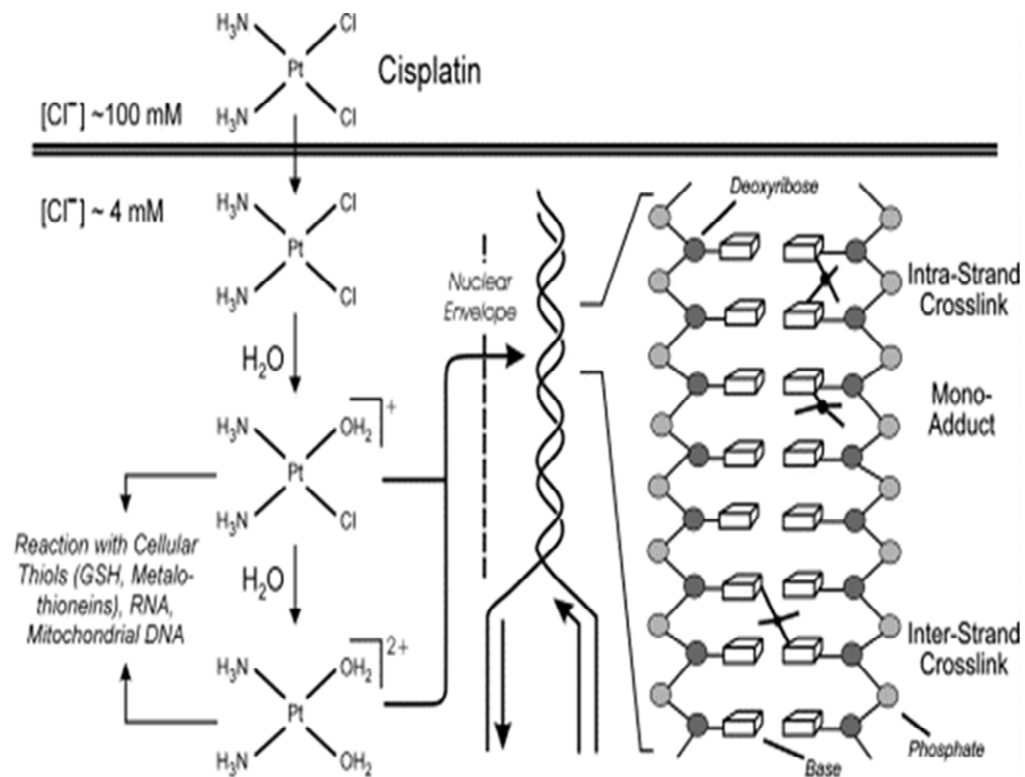


Figure 5. Les différents types d'adduits induits par le cisplatine dans la cellule. On retrouve les crosslinks intrabrin et interbrin, les monoadduits et la formation de crosslink entre protéines

Source: Kartalou, M et al. Mut Res, 478(1-2), 2001, pp 1-21

La réparation des dommages causés par les agents à base de platine

Il a été démontré que la majorité des dommages causés par les agents à base de platine sont détectés puis réparés par la machinerie du NER (Zamble, Mu et al., 1996). Ceci a été démontré à l'aide d'un essai *in vitro* de réparation des dommages causés par le cisplatine. Cet essai a permis de déterminer que, dans des extraits cellulaires, le NER peut exciser au moins un type de dommage introduit par le traitement au cisplatine, les crosslinks 1,2 intrabrin ApG. De plus, l'expression de gènes du NER, dont XPB, ERCC1 et XPA, est plus élevée dans les tissus ovariens cancéreux résistants au cisplatine (Dabholkar, Vionnet et al., 1994; Dabholkar, Thornton et al., 2000). Une étude clinique récente a aussi démontré que les patients ayant une expression réduite de ERCC1 sont plus susceptibles de répondre au traitement par le cisplatine (Olaussen, Dunant et al., 2006). Ceci suggère qu'une augmentation de la capacité du GG-NER permet d'augmenter la résistance des tissus cancéreux au dit traitement, alors qu'une réduction de cette capacité entraîne l'effet inverse.

Le MMR joue aussi un rôle mineur dans la sensibilité aux agents à base de platine. En effet, les cellules déficientes en MMR montrent une résistance plus élevée à ces agents (Aebi, Kurdi-Haidar et al., 1996; Massey, Offman et al., 2003; Stojic, Brun et al., 2004). De plus, des souris développent une résistance plus élevée au cisplatine lorsqu'elles ont été au préalable traitées avec ce composé, notamment par l'amélioration de leur capacité de

réparation des dommages induits (Oliver, Mercer et al., 2010). Dans cette étude, les souris traitées de façon prolongée au cisplatine développent des tumeurs résistantes au traitement. Ces tumeurs plus résistantes ont une augmentation de la capacité de réparation des dommages induits par rapport aux tumeurs sensibles au traitement et ont une expression plus élevée de nombreux gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN.

Parmi les autres mécanismes influant sur la sensibilité aux agents à base de platine, il y a le contrôle de l'influx et de l'efflux de ces agents par la cellule (Wang and Lippard, 2005). Il a été longtemps cru que le cisplatine pénètre à l'intérieur des cellules par diffusion majoritairement passive (Binks and Dobrota, 1990; Mann, Andrews et al., 1991). Toutefois, la protéine Ctr1, un transporteur de cuivre à haute affinité, a été récemment identifiée comme jouant un rôle dans le contrôle de l'influx de cisplatine dans la cellule, la mutation du gène CTR1 entraînant une plus grande sensibilité au cisplatine (Ishida, Lee et al., 2002; Holzer, Samimi et al., 2004). Quant à l'efflux, les protéines ATP7B et ABCC2 (aussi appelée MRP2) ont été identifiées comme jouant un rôle dans la sensibilité au cisplatine, probablement par le contrôle de l'efflux de cette drogue (Kool, deHaas et al., 1997; Cui, Konig et al., 1999; Komatsu, Sumizawa et al., 2000; Nakayama, Kanzaki et al., 2004).

Un autre mécanisme de résistance est la détoxification du cisplatine. Ceci est effectué par la conjugaison du cisplatine au glutathione. Il a été documenté que des lignées cellulaires provenant d'une même patiente atteinte du cancer de l'ovaire, avant et après le développement d'une résistance au traitement, montrent une augmentation de la

détoxification par le glutathione du cisplatine intracellulaire suite à l'acquisition de la résistance (Lewis, Hayes et al., 1988).

Outre ces mécanismes, il a aussi été observé que la délétion de la polymérase η , qui permet la réplication de l'ADN malgré la présence de lésions en contournant la lésion (translétion), permet de sensibiliser les cellules au cisplatine (Albertella, Green et al., 2005). Ceci a été observé pour d'autres polymérases, dont les polymérases β et γ (Hoffmann, Pillaire et al., 1995; Havener, Nick McElhinny et al., 2003).

On compte enfin de nombreuses autres causes à la résistance au cisplatine dont la liste complète serait trop exhaustive, entre autres des mutations dans les cascades activées en réponse à l'exposition aux agents à base de platine, par exemple des mutations dans la cascade des MAPK, de Akt, dans p53 et dans BRCA1 qui entraînent des conséquences, entre autres, sur le contrôle de l'apoptose, des points de contrôle du cycle cellulaire ou de la réparation de l'ADN (Husain, He et al., 1998; Kanamori, Kigawa et al., 1998; Datta, Brunet et al., 1999; Hayakawa, Ohmichi et al., 1999; Kigawa, Sato et al., 2002; Losa, Cobo et al., 2003; Mansouri, Ridgway et al., 2003; Wang and Lippard, 2005).

La mitomycine C

La mitomycine C (MMC) est un agent couramment utilisé pour traiter plusieurs cancers, dont le cancer anal et le cancer de la vessie (Meyer, Willett et al., 2010; Mike, Malcolm et al., 2010). Lorsqu'elle entre dans une cellule, la mitomycine C subit une réaction de réduction par des enzymes, ce qui l'active. Les dérivés obtenus peuvent ensuite agir comme agents alkylants de l'ADN (Tomasz and Lipman, 1981).

L'ADN est alkylé sur les guanines en position N2 et plusieurs formes de lésions sont créées, dont les crosslink intrabrins, interbrins et des monoadduits (Tomasz and Palom, 1997). La cytotoxicité de la MMC serait surtout dû aux crosslink interbrins (Dronkert and Kanaar, 2001; Palom, Suresh Kumar et al., 2002). De tous les crosslinks induits par le MMC, 54% sont des crosslink interbrins à une dose de 10 μ M de MMC (Palom, Suresh Kumar et al., 2002).

La MMC est donc un modèle intéressant pour l'étude de l'effet des ICLs sur les cellules humaines.

La réparation des ICLs

Il est estimé que 20 crosslinks interbrins (ICLs) sont suffisants pour provoquer la mort d'une cellule de mammifère dont le système de réparation est déficient (Lawley and Phillips, 1996).

Divers agents peuvent induire des ICLs, dont entre autres le cisplatine et la MMC mais aussi le psoralen et les moutardes azotées (Rajski and Williams, 1998). Les ICLs comptent pour 2-5% des crosslinks induits par le cisplatine alors que les crosslinks intrabrins comptent pour plus de 90% (Kartalou and Essigmann, 2001). Tout comme les crosslinks intrabrins, ils sont induits par le cisplatine lorsque l'azote en N7 de deux purines réagit avec l'agent en question pour former des liens covalents. Cependant, dans le cas des crosslink interbrins, il s'agit de deux purines sur des brins d'ADN opposés (Noll, Mason et al., 2005).

La réparation des ICLs est un phénomène complexe nécessitant l'interaction de plusieurs mécanismes moléculaires (voir figure 6) (Vasquez, 2010). Parmi eux, le NER et le MMR ont été identifiés comme pouvant interagir ensemble pour identifier et lier les ICLs (Zhao, Jain et al., 2009). De nombreuses protéines du NER ont été impliquées dans la réparation des ICLs, dont XPA, RPA, XPC–RAD23B, XPF et ERCC1 (Noll, Mason et al., 2006). Plus précisément, les protéines XPF et ERCC1 sont nécessaires à l'incision des ICLs (Kumaresan, Hwang et al., 2001).

De plus, il semblerait que la cascade de l'anémie de Fanconi soit impliquée dans le processus de réparation des ICLs, bien que peu soit connu sur le rôle précis de cette cascade (Pichierri and Rosselli, 2004; Wang and D'Andrea, 2004).

Un autre phénomène intéressant est que la réparation des ICLs semble être un phénomène spécifique à la phase S, du moins selon certains auteurs. Il a en effet été observé que la réplication de l'ADN est nécessaire pour induire une réponse de la cellule aux ICLs induits par le psoralen (Akkari, Bateman et al., 2000).

Des études ont aussi démontré l'implication de la synthèse translésion dans la réparation des ICLs. Ainsi, la réparation des ICLs nécessiterait au minimum la collaboration de la HR, de la cascade de l'anémie de Fanconi, de ERCC1, de XPF et de la polymérase κ , permettant la synthèse translésion (Zhang, Liu et al., 2007).

Toutefois, d'autres études ont suggéré l'existence d'une réparation indépendante de la réplication des ICLs, bien que cette voie aurait une importance plus réduite puisqu'elle implique une réparation propice à l'introduction d'erreurs, une copie intacte de l'ADN n'étant pas disponible comme en phase S (Zheng, Wang et al., 2003). Cette voie ne nécessiterait pas la HR mais plutôt essentiellement le NER et la synthèse translésion, entre autres grâce à la polymérase η (Zheng, Wang et al., 2003).

Enfin, une observation intéressante est que l'incision nécessaire à la réparation des ICLs provoque la formation d'une structure similaire à une fourche de réplication bloquée et qu'il est possible que ceci induise les mêmes mécanismes de réponse dans les deux cas,

par exemple la monoubiquitination de PCNA qui a été observée lors de l'incision des ICLs (Sarkar, Davies et al., 2006; Lehmann, Niimi et al., 2007).

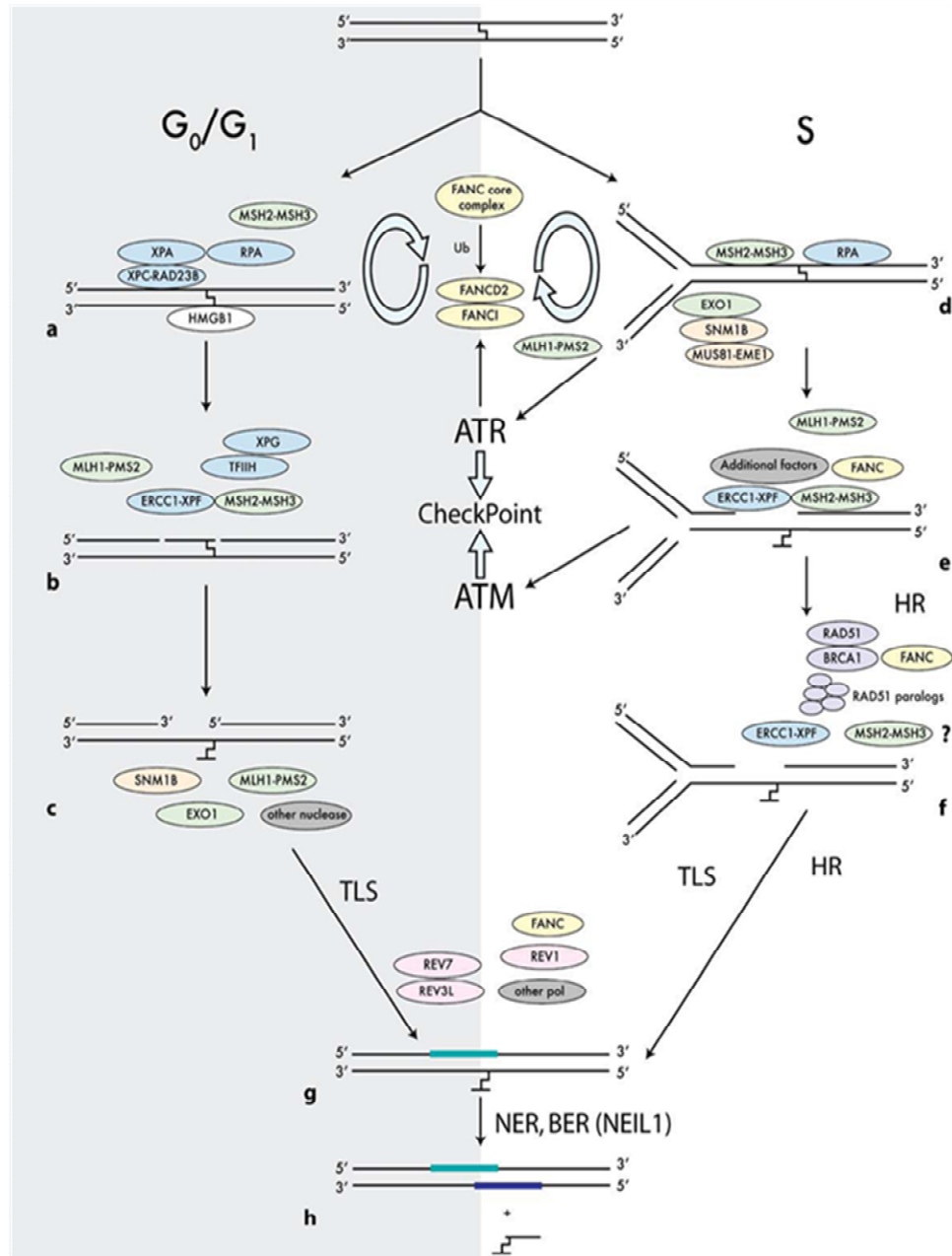


Figure 6. La réparation des ICLs chez les mammifères. Le mécanisme, encore sous étude, est complexe et nécessite l'interaction de plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN, dont le NER, le BER, le HR ainsi que des mécanismes de l'anémie de Fanconi et de la synthèse translésion. Deux mécanismes existent, l'un en G₀/G₁ et le deuxième en S.

Source: Vasquez, KM, Environmental and molecular mutagenesis, **51**(6), 2010, pp. 527-539

La réparation par le GG-NER spécifique au cycle cellulaire

Notre laboratoire a développé récemment un nouvel essai permettant d'évaluer la réparation par le GG-NER des CPDs et des 6-4PPs en fonction du cycle cellulaire. Cet essai est réalisé à l'aide de la technologie de la cytométrie de flux (Auclair, Rouget et al., 2008).

À l'aide de cet essai, il a été déterminé que la réparation des 6-4PPs et des CPDs par le GG-NER uniquement en phase S du cycle cellulaire est dépendante d'ATR. Il a aussi été montré que la réparation des 6-4PPs par le GG-NER est indépendante de p53 et d'ATM. Enfin, l'irradiation par les UVC à 25J/m^2 permet de bloquer le cycle cellulaire pendant une période d'au moins 24 heures (Auclair, Rouget et al., 2008).

Dans une étude subséquente, une autre protéine a été identifiée comme essentielle à la réparation des 6-4PPs et des CPDs uniquement en phase S du cycle cellulaire, la polymérase η . De plus, l'inhibition de la réplication par l'aphidicoline permet de restaurer partiellement la réparation des 6-4PPs par le GG-NER en phase S et l'irradiation par une dose relativement faible de UVC (5J/m^2) permet d'obtenir une réparation plus efficace des CPDs qu'à une dose plus élevée (15J/m^2) par le GG-NER en phase S, suggérant un effet important de la dose utilisée (Auclair, Rouget et al., 2010). Ceci pourrait être partiellement expliqué par un modèle suggérant que le rythme de l'incision des dommages en phase S pourrait être contrôlé par la signalisation cellulaire, afin d'empêcher par exemple la

formation d'un nombre trop important de DSBs, qui sont formés lorsque le GG-NER répare des lésions aux fourches de réplication bloquées (Auclair, Rouget et al., 2010).

Il a aussi été observé que sur 7 lignées cellulaires cancéreuses modèles testées, 3 ont une déficience importante de la réparation par le GG-NER des 6-4PPs en phase S, suggérant que cette déficience est commune à plusieurs cancers puisque les lignées cellulaires utilisées provenaient de divers tissus isolés de différentes patientes atteintes du cancer. (Auclair, Rouget et al., 2008).

Hypothèses et objectifs

Nous suggérons qu'une déficience de réparation du GG-NER en phase S est une caractéristique des cellules cancéreuses ovariennes et qu'elle jouerait un rôle dans la résistance clinique au cisplatine. Les cellules ayant cette déficience seraient aussi plus sensibles aux UVC et à la MMC. Enfin, cette déficience serait imputable à une modification de l'activité de la kinase ATR dans ces lignées.

Afin de vérifier ces hypothèses, nos objectifs sont de:

- Déterminer l'efficacité du GG-NER en fonction du cycle cellulaire de diverses lignées cellulaires isolées de tumeurs ovariennes à l'aide d'une technique par cytométrie de flux développée dans notre laboratoire
- Déterminer si l'exposition à la chimiothérapie peut entraîner par sélection une modification de l'efficacité du GG-NER en phase S par la technique indiquée ci-dessus en comparant des paires de lignée isolées préalablement à la chimiothérapie et suite à la chimiothérapie d'une même patiente
- Corréler l'efficacité du NER avec la sensibilité au cisplatine, à la MMC et aux UVC à l'aide de la survie clonogénique
- Vérifier l'induction de γ H2AX par immunofluorescence dans les diverses lignées afin de déterminer si la kinase ATR a un niveau d'activité modifié dans ces lignées

Matériel et méthodes

Culture cellulaire

Les cellules cancéreuses d'origine ovarienne (voir annexe 1) ont été gracieusement fournies par les Dr Anne-Marie Mes-Masson et Diane Provencher. Les cellules ovariennes ont été cultivées en adhérence dans du milieu OSE (Wisent) enrichi de 10% de FBS, de L-glutamine et d'antibiotiques (Wisent). Les lignées F02-98 et Seckel ont été obtenues du Dr P Jeggo (University of Sussex) et ont été cultivées dans du milieu EMEM supplémenté de 15% FBS, de L-glutamine et d'antibiotiques (Wisent). Toutes les lignées ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ et les lignées TOV2295 et OV2295 ont été cultivées dans un environnement à faible teneur en oxygène, soit 7%.

Conditions d'irradiation

Les cellules ont été trypsinisées puis transférées sur des pétris de 60mm la veille de l'irradiation à une densité de 500 000 cellules par pétri de 60mm afin d'obtenir des cellules en phase exponentielle. Les cellules ont ensuite été rincées une fois avec de la saline tamponnée avec du phosphate (PBS) puis ont été irradiées dans 2,5 ml de PBS à une dose de 25 J/m² et à une fluence de 0,2 J/m²/s à l'aide d'une lampe germicide Philips G25T8, soit pour une durée de 2 minutes 47 secondes.

Détermination de la capacité de réparation des 6-4PPs en fonction du cycle cellulaire

Après irradiation des cellules, celles-ci ont été recouvertes de milieu et incubées pour le temps indiqué. Suite à ce temps d'incubation, les cellules ont été rincées une fois

avec du PBS puis ont été trypsinisées. Les cellules trypsinisées ont été récupérées dans 1 ml de PBS. Ensuite, 3 ml d'éthanol anhydre froid ont été ajoutés et les cellules ont été placées à -20°C pour un minimum de 12 heures. Pour fin de contrôle, certaines cellules n'ont pas été irradiées et d'autres ont été trypsinisées immédiatement après l'irradiation. Ces contrôles permettent d'établir l'autofluorescence des cellules et la fluorescence totale lorsqu'aucun dommage n'est réparé.

Ensuite, les cellules ont été resuspendues dans une solution aqueuse à 0,2N d'acide chlorhydrique et 0,5% de Triton-X-100 pendant 5 minutes à température pièce afin de perméabiliser les membranes. Après avoir été rincées une fois à l'aide de PBS, elles ont été resuspendues dans une solution de PBS à 100 g/ml de ARNase pour 45 minutes à 37°C. Elles ont ensuite été rincées une fois à l'aide d'une solution de PBS à 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) et 0,25% de Tween-20 (PBS-TB). Puis, elles ont été resuspendues dans une solution de PBS-TB contenant des anticorps anti-6-4PPs isolés de souris (Kamiya) dilués 1/1000 pendant 1h30 à température pièce. Après un rinçage à l'aide de PBS-TB, elles ont été resuspendues dans une solution de PBS-TB contenant des anticorps anti-souris couplés au FITC (Sigma) dilués 1/200 pendant 1h à température pièce dans l'obscurité. Après un nouveau rinçage au PBS, elles ont été resuspendues dans 0,5ml d'une solution de PBS à 5 g/ml d'iodure de propidium (PI) à 4°C pendant un minimum de 12 heures.

Les cellules ont ensuite été analysées à l'aide d'un FACScan ou d'un FACSCalibur (BD). Les cellules dans chaque phase du cycle cellulaire ont été isolées à l'aide du logiciel FlowJo selon le marquage au PI et le pourcentage de réparation des 6-4PPs a été obtenu en soustrayant l'autofluorescence du FITC (cellules non traitées) des unités de fluorescence obtenues pour chacune des conditions puis en comparant les unités obtenues avec le nombre d'unités obtenues dans les cellules n'ayant pas été incubées suite à l'irradiation (0h d'incubation, donc 100% du dommage non réparé). La mesure de la moyenne géométrique de la fluorescence est utilisée à cet effet.

Survie clonogénique

Pour les différentes survies clonogéniques (MMC, cisplatine et UVC) les cellules ont été comptées puis mises pour incubation un minimum de 12 heures avant le traitement dans des pétris de 100mm à diverses concentrations.

Les cellules ont ensuite été rincées avec du PBS puis traitées avec l'agent cytotoxique approprié à la dose/concentration indiquée. Dans le cas des UVC, l'irradiation a été effectuée tel qu'indiqué ci-dessus. La MMC a été préparée fraîchement la journée même de l'expérience en solution aqueuse. Quant au cisplatine, la solution saline a été préparée préalablement puis stockée à -20°C.

Les traitements au cisplatine et à la MMC ont été effectués dans l'obscurité afin d'éviter la dégradation de ces agents. Les agents ont été ajoutés aux concentrations indiquées dans du milieu OSE sans sérum. Suite à cela, une incubation de 2 heures à 37°C

a été effectuée dans le milieu sans sérum contenant l'agent cytotoxique. Une fois l'incubation terminée, les cellules ont été rincées une fois avec du PBS puis 10ml de milieu OSE complet ont été ajoutés avant d'incuber à 37°C les cellules jusqu'à l'apparition de colonies visibles (7 à 21 jours). Dans tous les cas, certains pétris ont subi le même protocole mais sans ajout de l'agent cytotoxique à des fins de contrôle.

Dans le cas des UVC, suite au traitement du milieu complet a immédiatement été ajouté aux cellules qui ont été incubées à 37°C jusqu'à apparition de colonies visibles.

Les pétris ont finalement été rincés avec du PBS puis 5 ml de solution 0,5% bleu de méthylène/ 50% méthanol ont été ajoutés à chacun des pétris pendant cinq minutes. Les pétris ont ensuite été rincés à l'eau puis les colonies visibles ont été comptées et comparées aux colonies obtenues sur les pétris contrôle.

Détection de γ H2AX par immunofluorescence

300 000 cellules ont été comptées puis ajoutées à 5ml de milieu dans des pétris de 35mm au fond desquels une lamelle de verre avait été préalablement disposée. Après une incubation d'environ 16 heures à 37°C, les cellules ont été irradiées tel que décrit précédemment à une dose de 25J/m². Suite à l'irradiation, du milieu de culture a été ajouté et les cellules ont été incubées à 37°C pendant 2 heures. Pour les étapes subséquentes, toutes les incubations ont été effectuées à température pièce sauf indication contraire. Ensuite, elles ont été fixées dans une solution de PBS avec 3% de paraformaldéhyde. Les pétris ont été scellés avec du parafilm et déposés à 4°C pour un minimum de 12 heures.

Les cellules ont ensuite été rincées avec du PBS puis incubées 10 minutes dans une solution perméabilisante de PBS avec 0,5% de Triton-X-100. Une solution de blocage a ensuite été versée dans le pétri (PBS avec 10% de FBS et 0,1% de Triton-X-100) et les cellules ont été incubées 1 heure dans cette solution. La solution de PBS/10% FBS/0,1% Triton-X-100 plus un anticorps anti-  H2AX de souris dilué 1/500 ont ensuite été utilis  es pour incuber les cellules pendant 2 heures dans une chambre humidifi  e. Suite à cette incubation, les cellules ont été rinc  es trois fois pendant cinq minutes dans du PBS puis la solution de blocage contenant cette fois un anticorps anti-souris couplé à Alexa 488 dilué 1/500 a été ajout  e aux cellules pour une durée de 1 heure dans une chambre humidifi  e. Les cellules ont ensuite été rinc  es trois fois pendant cinq minutes avec du PBS puis marqu  es à l'aide d'une solution de DAPI (80 g/ml dans du PBS) pendant 10 minutes. Trois nouveaux rinçages de cinq minutes chacun avec du PBS ont ensuite été réalisés puis les lamelles ont été mont  es sur des lames à l'aide de milieu de montage et enfin ont été scell  es avec du vernis à ongles. Les lames ont été plac  es    4  C pour au minimum 12 heures et ont ensuite été observ  es à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica DMRE. Les images ont été acquises grâce à une caméra RETIGA EX (QIMAGING) et du logiciel OpenLab 3.1.1.

Résultats

Préambule

Afin de réaliser les divers objectifs mentionnés, une librairie de cellules isolées du cancer de l’ovaire (malin) était essentielle. Celle-ci nous a été gracieusement fournie par les Dr Anne-Marie Mes-Masson et Diane Provencher. Un résumé des informations pertinentes connues sur ces cellules (toutes isolées de cancers épithéliaux ovariens) est disponible en Annexe 1.

En résumé, la majorité des lignées ont été isolées de cancers ayant un histotype séreux, proviennent directement d’une tumeur ou bien de l’ascite et ont été isolées pré-chimiothérapie ou post-chimiothérapie. Les lignées n’ayant pas un histotype séreux sont Tov21G (cellules claires) et Ov90 (adénocarcinome). 3 paires de lignées ont été isolées de la même patiente (une lignée pré-chimiothérapie puis une deuxième post-chimiothérapie), soit les lignées Tov1369TR et Ov1369(2), Tov2295 et Ov2295 ainsi que Tov3133G et Ov3133.

Hétérogénéité de la capacité de réparation du GG-NER dans les lignées dérivées de cancers de l'ovaire

Diverses lignées cellulaires dérivées du cancer de l'ovaire ont été analysées afin de déterminer leur capacité de réparation de l'ADN en réponse à l'irradiation par les UVC. Leur capacité de réparation a été déterminée en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle la cellule se trouvait. Ceci a été effectué à l'aide d'un double marquage à l'iodure de propidium (PI) et à l'aide d'un anticorps anti-6-4PPs couplé au FITC suivi par une analyse à l'aide de la cytométrie de flux (voir matériel et méthodes). Cette technique a été développée précédemment dans notre laboratoire (Auclair, Rouget et al., 2008; Rouget, Auclair et al., 2008).

Une hétérogénéité importante a été observée dans la capacité de réparation des diverses lignées dans toutes les phases du cycle cellulaire, mais particulièrement en phase S (voir figure 7). En effet, les lignées Ov866(2), Tov2223G et Ov90 ont une capacité de réparation importante, et ce dans toutes les phases du cycle cellulaire. Tov2835EP montre une déficience importante dans la réparation des 6-4PPs relativement aux autres lignées, et ce dans toutes les phases du cycle cellulaire. La lignée ayant une capacité de réparation, en G1 et en G2, la plus proche de Tov2835EP est Ov3331. Enfin, Tov21G, Ov3331 et Ov1946 ont une déficience marquée spécifiquement en phase S du cycle cellulaire, leurs capacités de réparation des 6-4PPs par le GG-NER dans les phases G1 et G2 étant très proches sinon plus efficaces que celles de certaines lignées réparant bien en phase S du cycle cellulaire. Le phénomène de réparation peut aussi être observé en fonction du temps

en produisant une cinétique de réparation (voir figure 7B) et ceci permet d'observer que la réparation en G1 et en G2 se fait de façon relativement constante en fonction du temps dans les lignées utilisées mais que la réparation en S en fonction du temps ne s'effectue de la même façon (c'est-à-dire de façon constante) que dans la lignée Ov866(2). Il semblerait donc que la capacité de réparation en phase S du cycle cellulaire par le GG-NER soit un phénomène distinct de la réparation en phase G1 et G2 dans le cancer de l'ovaire, et que ce

phénomène puisse être dérégulé alors que la réparation en G1 et en G2 ne l'est pas.

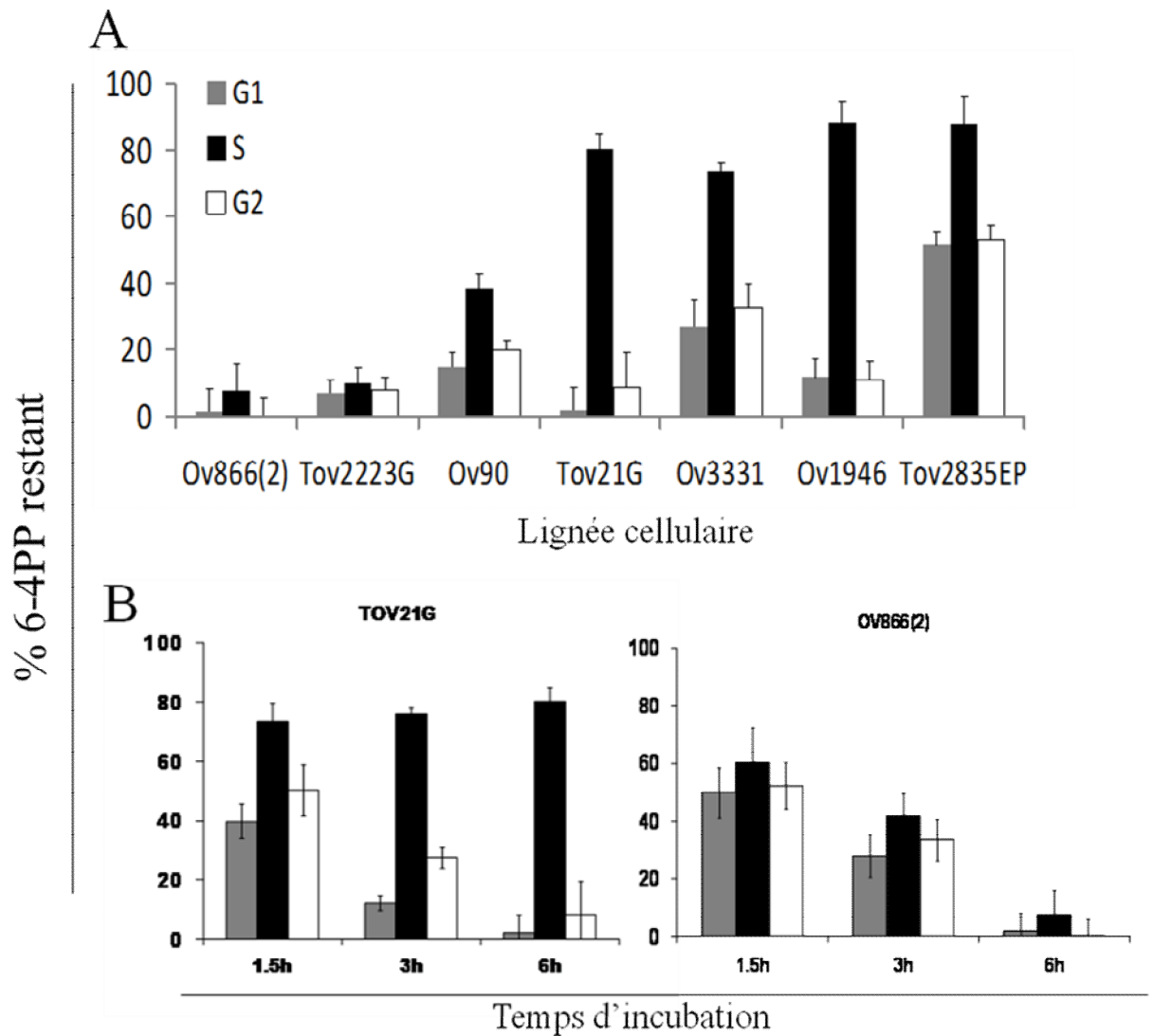


Figure 7. Capacité de réparation hétérogène dans 7 lignées dérivées du cancer de l'ovaire. A. Les résultats représentent le pourcentage de 6-4PP non-réparé 6h post-UV. **B.** Cinétiques de réparation des 6-4PP dans deux lignées modèles. (Moyenne \pm erreur standard de la moyenne de trois expériences indépendantes montrée)

Modification de la capacité de réparation par le GG-NER suite aux traitements chimiothérapeutiques

Ensuite, nous avons analysé trois paires de lignées cellulaires isolées du cancer de l'ovaire, l'une des lignées de la paire étant isolée de la tumeur pré-chimiothérapie et la deuxième étant isolée de la même patiente post-chimiothérapie. L'analyse de leur capacité de réparation par le GG-NER des 6-4PPs a été réalisée tel que décrit dans la section précédente.

Pour deux des trois paires de lignées testées, nous avons observé une augmentation significative de la capacité de réparation par le GG-NER des 6-4PPs après chimiothérapie (figure 8). La paire isolée de la patiente 1369 (Tov1369TR et Ov1369(2)) montre une augmentation importante de la réparation par le GG-NER des 6-4PPs uniquement en phase S. Quant à la paire isolée de la patiente 3133, une augmentation importante de cette capacité de réparation est observée dans toutes les phases du cycle cellulaire. Enfin, la paire isolée de la patiente 2295 ne montre aucun changement significatif de la réparation par le GG-NER des 6-4PPs, et ceci autant en phase S que dans les phases G1 et G2. Ces résultats suggèrent que les traitements chimiothérapeutiques pourraient entraîner une augmentation de la capacité de réparation de l'ADN par le GG-NER dans les cellules cancéreuses, laissant supposer que cette augmentation pourrait avoir un rôle à jouer dans le développement de la résistance à la chimiothérapie.

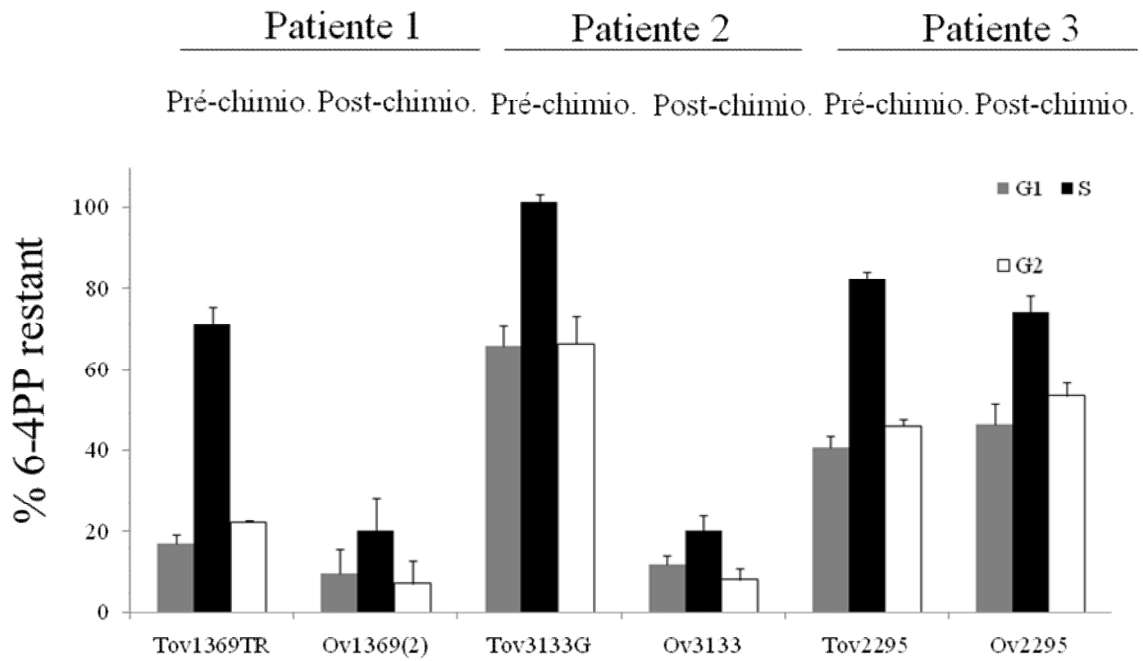


Figure 8. Une capacité de réparation plus efficace du GG-NER peut être acquise suite à la chimiothérapie. Trois paires de lignées isolées chez des patientes avant et après la chimiothérapie et leurs capacités de réparation par le GG-NER des 6-4PPs sont montrées (Moyenne \pm erreur standard de la moyenne de trois expériences indépendantes montrée)

Les lignées cellulaires isolées du cancer de l'ovaire ayant une bonne capacité de réparation en phase S sont plus résistantes au cisplatine

Puisque le NER a été impliqué dans la réparation des dommages induits par le cisplatine (Zamble, Mu et al., 1996), nous avons ensuite voulu vérifier s'il existe une corrélation entre la capacité de réparation par le GG-NER et la sensibilité au cisplatine *in vitro*.

Nous avons donc mesuré la sensibilité de lignées cellulaires cancéreuses d'origine ovarienne à cet agent à l'aide de la survie clonogénique, qui permet de mesurer la capacité d'une cellule à se multiplier suite à l'exposition à un agent cytotoxique afin d'estimer sa viabilité (Hoffman, 1991) (voir matériel et méthodes).

Nous n'avons pas observé de corrélation entre la capacité de réparation par le GG-NER dans les phases G1 et G2 et la sensibilité au cisplatine (résultats non montrés). Par contre, les lignées cellulaires ne réparant pas en phase S par le GG-NER les 6-4PPs se sont avérées significativement plus sensibles au cisplatine *in vitro*. Un test de Student non-pairé avec variance égale a été effectué en répartissant les lignées en deux groupes, soit les lignées réparant bien le dommage en face S (plus de 50% réparé après 6h) et les lignées réparant peu les dommages en S (moins de 50% réparé après 6h). Les deux groupes ont été constitués comme ceci : Ov90, Ov1369(2), Tov2223G et Ov866(2) pour le premier groupe (réparation efficace en phase S) et Ov1946, Tov2835EP, Tov21G, Ov3331 et Tov1369TR

(réparation moins efficace en phase S) pour le deuxième groupe. Un test de Student non-pairé avec variance égale a ensuite été appliqué pour mesurer si les IC50 des deux groupes sont statistiquement différents. Ceci a permis de démontrer qu'ils le sont à 99% de certitude ($P=0,01$).

L'analyse du tableau I permet d'observer que plus la capacité de réparation par le GG-NER en phase S est importante, plus, en général, la lignée cellulaire est résistante au cisplatine. Les lignées ayant une bonne capacité de réparation des 6-4PPs en phase S sont en moyenne 4,26 fois plus résistantes au cisplatine que les lignées ayant une mauvaise capacité de réparation des 6-4PPs en phase S.

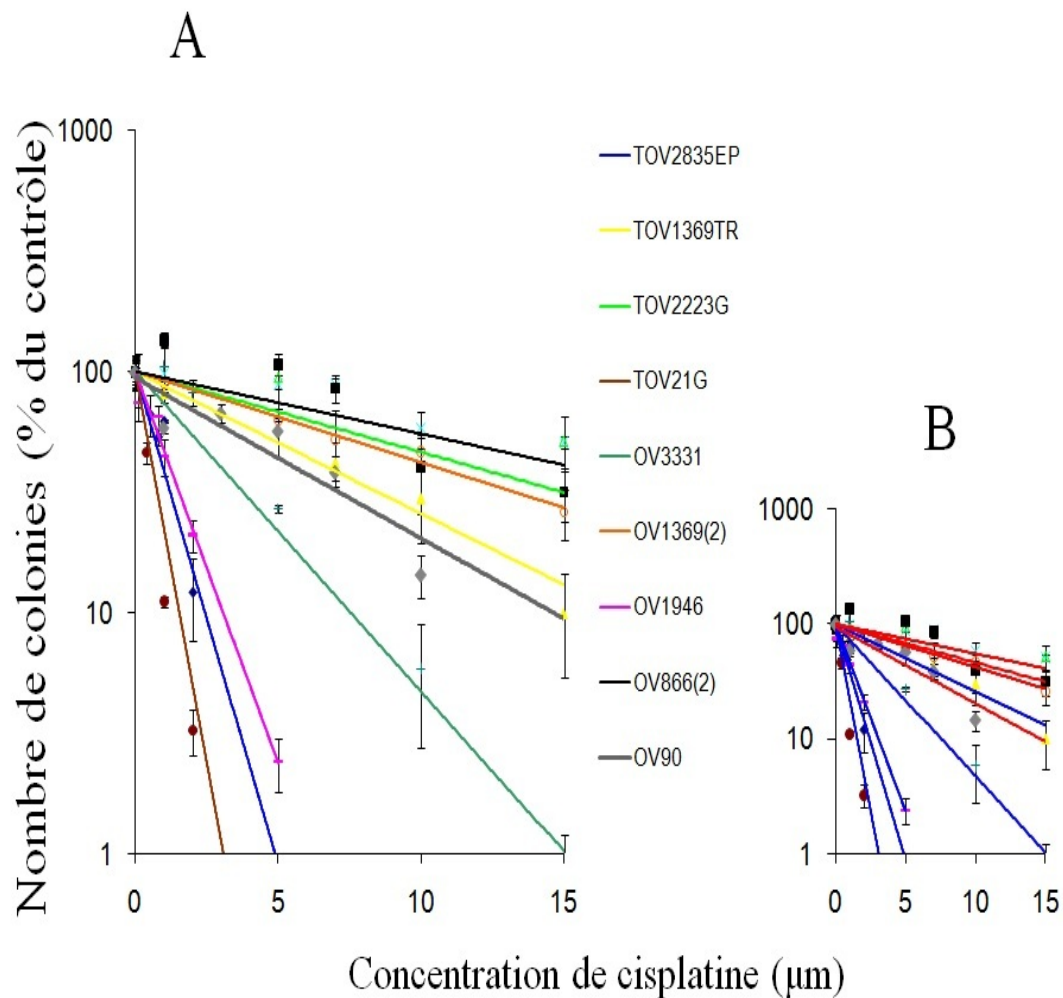


Figure 9. Les lignées cellulaires dérivées du cancer de l'ovaire déficientes en GG-NER en phase S sont relativement plus sensibles au cisplatine. **A.** Courbes de tendance des survies clonogéniques effectuées sur 9 lignées cellulaires différentes **B.** Courbes de tendance des survies clonogéniques effectuées sur 9 lignées cellulaires différentes, déficientes en GG-NER en phase S (bleu) ou efficaces en GG-NER en phase S (rouge) (Moyenne \pm erreur standard de la moyenne de trois expériences indépendantes montrée)

Tableau I. Corrélation entre la sensibilité au cisplatine et la capacité de réparation par le GG-NER en phase S dans 9 lignées cellulaires ovariennes

	Lignée cellulaire	%6-4PP restant en phase S après une incubation de 6h post-traitement UV	IC50 du cisplatine (μ M) déterminé par survie clonogénique	Moyenne des IC50
Lignées ayant une capacité de réparation réduite en S	OV1946	88 \pm 6	0.88	2.03
	TOV2835EP	88 \pm 8	0.85	
	TOV21G	80 \pm 8	0.31	
	OV3331	74 \pm 2	3.00	
	TOV1369TR	71 \pm 4	5.09	
Lignées ayant une capacité de réparation importante en S	OV90	38 \pm 5	4.14	8.63
	OV1369(2)	20 \pm 13	7.26	
	TOV2223G	10 \pm 4	11.04	
	OV866(2)	7 \pm 8	12.09	

Les lignées cellulaires isolées du cancer de l’ovaire ayant une bonne capacité de réparation en phase S sont plus résistantes à la MMC

Afin de vérifier si cette corrélation s’applique à tous les agents induisant des crosslinks, nous avons choisi de tester la sensibilité des cellules étudiées à un deuxième agent induisant de telles lésions, la mitomycine C.

Ceci a été réalisé à nouveau par survie clonogénique. La mitomycine C est utilisée comme agent modèle pour mesurer la sensibilité de cellules aux ICLs, les ICLs étant responsables de sa cytotoxicité (Dronkert and Kanaar, 2001; Palom, Suresh Kumar et al., 2002).

Nous avons obtenu une tendance similaire à celle obtenue pour le cisplatine, c’est-à-dire que les lignées réparant bien les 6-4PPs en phase S, donc ayant un GG-NER efficace, sont en général plus sensibles (voir figure 10). Cependant, cette tendance n’est pas statistiquement significative à 95% de certitude ($P=0,10$, test de Student non païré avec variance égale). Ce test a été réalisé de façon analogue à la procédure décrite pour le cisplatine. On peut toutefois remarquer qu’en moyenne les lignées réparant bien les 6-4PPs en phase S du cycle cellulaire sont 2,55 fois moins sensibles à la MMC que les lignées réparant mal les 6-4PPs en phase S du cycle cellulaire (calculé à partir du IC50). Ce chiffre est plus élevé si on élimine du calcul la lignée OV3331, qui est sensiblement plus résistante à la MMC que la moyenne des lignées ayant une capacité de réparation des 6-4PPs en

phase S réduite : les lignées ayant une bonne capacité de réparation des 6-4PPs en phase S sont alors 5,23 fois plus résistantes et ceci est statistiquement significatif à 95% de certitude ($P=0,02$).

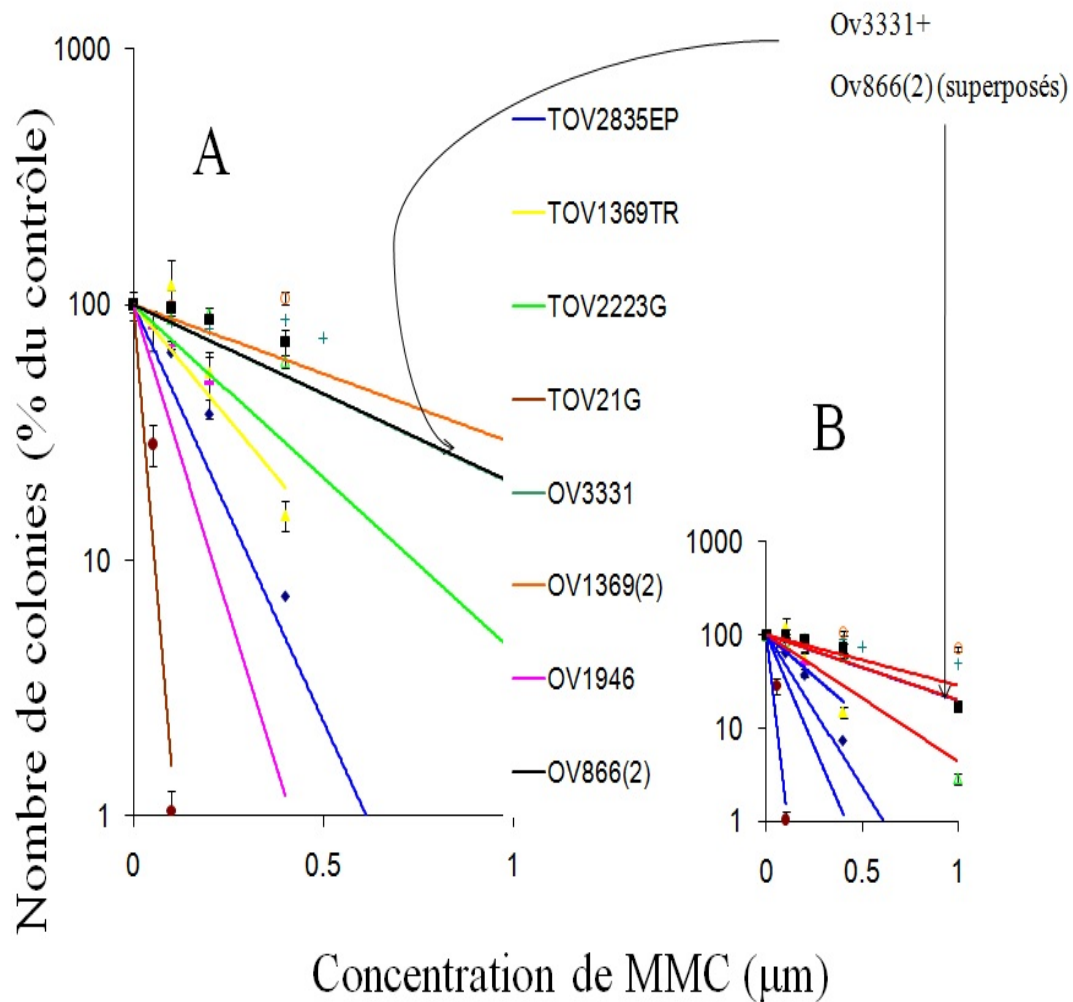


Figure 10. Les lignées cellulaires dérivées du cancer de l'ovaire déficientes en GG-NER en phase S sont en général plus sensibles à la MMC. **A.** Courbes de tendance des survies clonogéniques effectuées sur 8 lignées cellulaires différentes **B.** Courbes de tendance des survies clonogéniques effectuées sur 8 lignées cellulaires différentes, déficientes en GG-NER en phase S (bleu) ou efficaces en GG-NER en phase S (rouge) (Moyenne \pm erreur standard de la moyenne de trois expériences indépendantes montrée)

Tableau II. Sensibilité à la MMC et capacité de réparation par le GG-NER correspondante en phase S dans 8 lignées cellulaires ovariennes

	Lignée cellulaire	%6-4PP restant en phase S après une incubation de 6h post-traitement UV	IC ₅₀ de la MMC (μM) déterminé par survie clonogénique	Moyenne des IC ₅₀
Lignées ayant une capacité de réparation réduite en S	OV1946	88 ± 6	0.10	0.20
	TOV2835EP	88 ± 8	0.13	
	TOV21G	80 ± 8	0.02	
	OV3331	74 ± 2	0.56	
	TOV1369TR	71 ± 4	0.20	
Lignées ayant une capacité de réparation importante en S	OV1369(2)	20 ± 13	0.76	0.51
	TOV2223G	10 ± 4	0.30	
	OV866(2)	7 ± 8	0.47	

Les lignées cellulaires isolées du cancer de l’ovaire ayant une bonne capacité de réparation en phase S sont légèrement plus résistantes aux UVC

Puisque le GG-NER est le mécanisme privilégié pour la réparation des lésions à l’ADN induites par les UVC, nous avons ensuite étudié l’effet d’une déficience en GG-NER en phase S sur la sensibilité aux UVC par survie clonogénique.

À cette fin, nous avons mesuré la survie clonogénique par rapport à un contrôle non irradié des lignées étudiées, à 5 J/m^2 et à 15 J/m^2 (voir figure 11).

Nous avons obtenu une tendance similaire à celle obtenue pour le cisplatine ou la MMC. Cependant, la différence moyenne de la survie clonogénique entre les lignées ne réparant pas en phase S et celles réparant en phase S par le GG-NER est seulement de 1,92 fois plus élevée pour celles réparant en phase S par le GG-NER (à 5 J/m^2). De plus, cette corrélation n’est pas statistiquement significative à 95% de certitude ($P=0,07$, test de Student non pairé avec variance égale). À nouveau, ce test a été effectué de façon analogue à celui utilisé pour le cisplatine, en utilisant les taux de survie des différentes lignées à 5 J/m^2 . Ceci laisse supposer que la réparation en phase S par le GG-NER jouerait un rôle mineur dans la sensibilité aux rayons UVC.

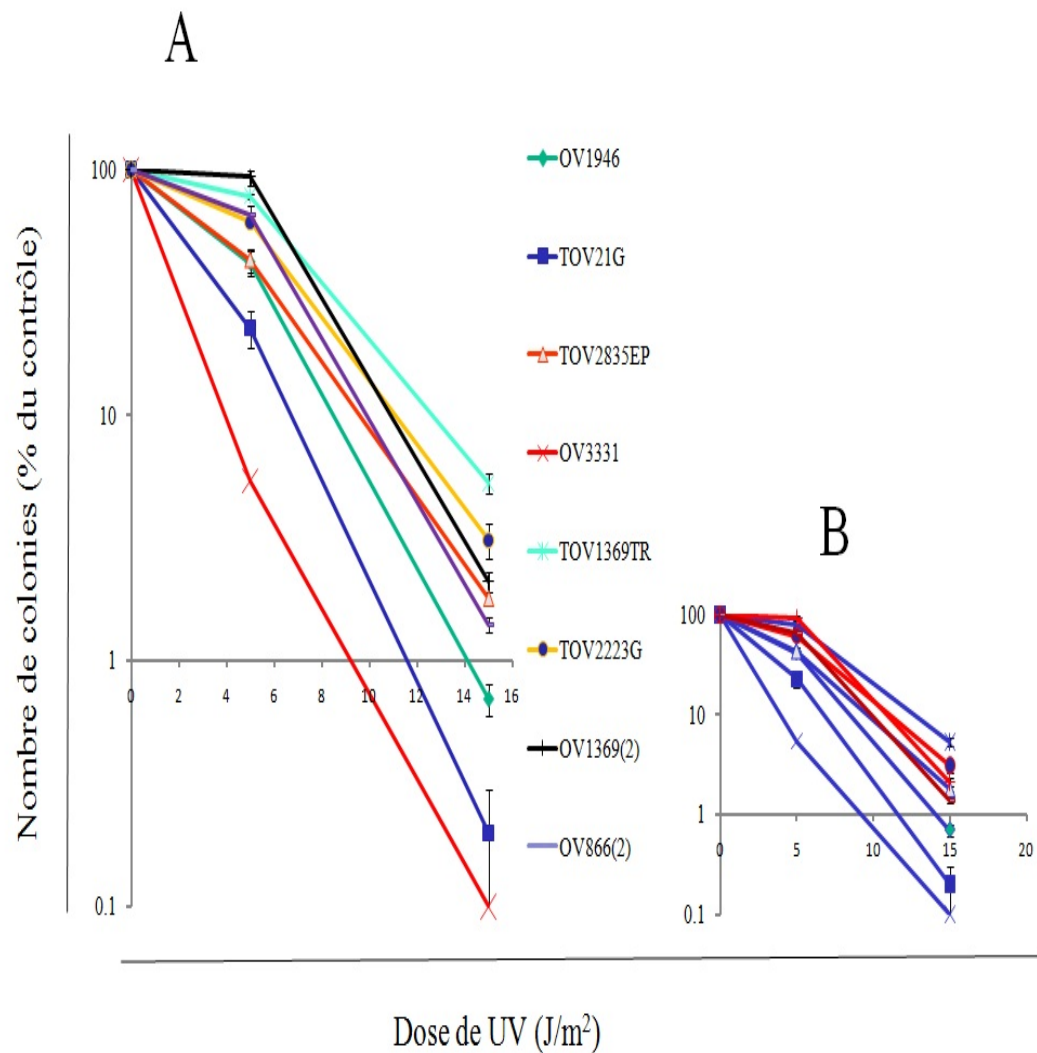


Figure 11. Les lignées cellulaires dérivées du cancer de l’ovaire déficientes en GG-NER en phase S sont légèrement plus sensibles aux UVC. **A.** Courbes de tendance des survies clonogéniques effectuées sur 8 lignées cellulaires différentes **B.** Courbes de tendance des survies clonogéniques effectuées sur 8 lignées cellulaires différentes, déficientes en GG-NER en phase S (bleu) ou efficaces en GG-NER en phase S (rouge) (Moyenne \pm erreur standard de la moyenne de trois expériences indépendantes montrée)

Tableau III. Sensibilité aux UV de 8 lignées cancéreuses ovariennes et leurs capacités correspondantes de réparation en phase S des 6-4PPs

	Lignée cellulaire	% 6-4PP restant en phase S après une incubation de 6h post-traitement UV	Nombre de colonies restantes (% du contrôle) après une irradiation UVC de 5J/m ²	Nombre de colonies restantes (% du contrôle) après une irradiation UVC de 15J/m ²	Moyenne du nombre de colonies restantes (% du contrôle) après une irradiation UVC de 5J/m ²
Lignées ayant une capacité de réparation réduite en S	OV1946	88 ±6	41.9 ±4.9	0.7 ±0.1	38.2
	TOV21G	80 ±8	22.7 ±3.8	0.2 ±0.1	
	TOV2835 EP	88 ±8	42.9 ±4.8	1.8 ±0.1	
	OV3331	74 ±2	5.4 ±1.3	0.1 ±0.1	
	TOV1369 TR	71 ±4	78.1 ±2.1	5.3 ±0.5	
Lignées ayant une capacité de réparation importante en S	TOV2223 G	10 ±4	61.2 ±0.8	3.1 ±0.5	73.53
	OV1369 (2)	20 ±13	93.5 ±6.6	2.1 ±0.2	
	OV866 (2)	7 ±8	65.9 ±5.5	1.4 ±0.1	

L'activité de la kinase ATR est similaire dans les diverses lignées du cancer de l'ovaire humain étudiées

La kinase ATR contrôle la réparation par le GG-NER en phase S du cycle cellulaire uniquement (Auclair, Rouget et al., 2008). Nous avons donc voulu vérifier si elle était activée par les UVC dans les diverses lignées cellulaires d'origine ovarienne étudiées. Afin de mesurer cette activation, nous avons choisi d'étudier la phosphorylation de l'un de ses substrats les plus étudiés, l'histone modifiée H2AX (Ward and Chen, 2001; Hanasoge and Ljungman, 2007). Nous avons réalisé ceci par immunofluorescence (voir matériel et méthodes). À des fins de contrôle, nous avons d'abord réalisé l'expérience sur des cellules isolées d'un patient atteint du syndrome de Seckel, ce syndrome étant caractérisé par une activité faible de la kinase ATR. Nous avons aussi réalisé ceci sur les cellules 1BR, fortement apparentées aux cellules Seckel mais ayant une capacité de phosphorylation par ATR intacte. Tel qu'attendu, les cellules isolées du syndrome de Seckel montrent une phosphorylation très faible de γ H2AX alors que les 1BR montrent une capacité beaucoup plus élevée (figure 12).

Les résultats obtenus avec les lignées de cancer ovarien montrent que la kinase ATR a une activité relativement équivalente dans toutes ces lignées (figure 12). En effet, toutes les lignées montrent une phosphorylation importante de γ H2AX suite à l'irradiation aux UVC

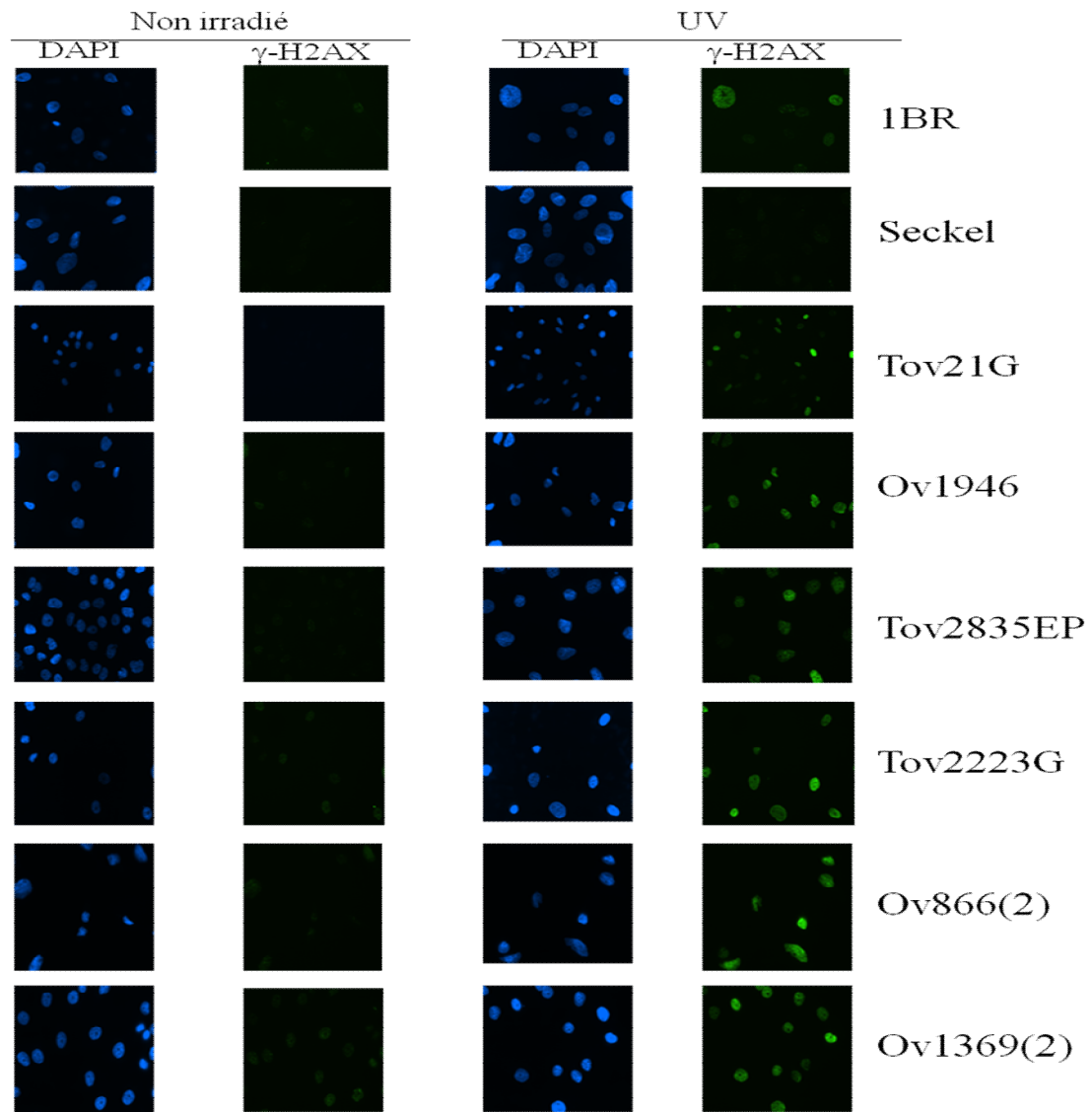


Figure 12. Les lignées cellulaires dérivées du cancer de l’ovaire montrent toutes une induction de γ H2AX suite à l’irradiation UVC. Les lignées Seckel et 1BR, ayant respectivement une capacité réduite et normale de phosphorylation par ATR, ont été utilisées comme contrôles. Le temps d’exposition lors de la prise de la photographie est constant entre les diverses lignées. Les résultats présentés représentent trois expériences indépendantes.

Discussion

Rappel du projet

Le cancer de l’ovaire est un type de cancer particulièrement mortel (Jemal, Siegel et al., 2008). La plupart des patientes répondent initialement aux traitements chimiothérapeutiques, mais la majorité rechutent et éventuellement en meurent (Agarwal and Kaye, 2003; Ozols, 2005).

Il a été observé précédemment que certaines lignées tumorales modèles ont une déficience en GG-NER uniquement en phase S (Auclair, Rouget et al., 2008). Nous avons donc voulu déterminer si cette déficience se retrouve dans des lignées cellulaires isolées du cancer de l’ovaire et si cette déficience a un impact sur le traitement des tumeurs, le NER jouant un rôle crucial dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques à base de platine (Zamble, Mu et al., 1996).

La déficience en GG-NER en phase S pouvant être causée par une délétion de la kinase ATR (Auclair, Rouget et al., 2008), nous avons ensuite voulu déterminer si la cascade de détection des dommages et d’activation des processus moléculaires de défense contre ces dommages contrôlée par ATR est déficiente dans les lignées montrant une faible capacité relative de réparation des dommages en phase S par le GG-NER.

Déficiences dans la réparation par le GG-NER en phase S du cycle cellulaire

Il apparaît à prime abord surprenant que le GG-NER soit déficient uniquement en phase S dans plusieurs lignées de cancer de l’ovaire et que cette déficience soit aussi répandue (voir figure 7). Toutefois, le cancer étant causé d’abord par une instabilité génomique entraînant des mutations dans des gènes-clé, une telle déficience pourrait être à l’origine du développement de mutations. Celles-ci entraîneraient éventuellement le développement du cancer si le dommage à l’ADN induit en phase S est mal géré. Ceci pourrait expliquer la fréquence de cette capacité réduite de réparation par le GG-NER en phase S dans les lignées cancéreuses.

De plus, des études précédentes ont déjà démontré que des différences dans la réparation des dommages par le NER dans différents cancers sont présentes. Par exemple, il a été démontré que les lignées isolées du cancer des testicules, qui est souvent très sensible au cisplatine, ont des niveaux plus faibles de diverses protéines du NER, dont XPA, ERCC1 et XPF, que la plupart des cancers (Welsh, Day et al., 2004). Le cancer de l’ovaire étant lui aussi relativement sensible au cisplatine, il est plausible que de tels défauts dans le NER soient fréquemment présents, tel que le suggère ce mémoire.

Des cellules ayant développé une telle déficience pourraient s’avérer plus à risque d’évoluer en cellules cancéreuses. Une possibilité intéressante serait que certains individus aient une déficience dans la réparation par le GG-NER en phase S qui soit innée, ce qui

pourrait éventuellement être utilisé à des fins pronostiques pour détecter les individus les plus à risque de développer un cancer. Ceci nécessiterait toutefois le développement d'un test rapide permettant de repérer ce phénomène, et cela ne peut être réalisé tant que le processus de réparation par le GG-NER en phase S n'est pas fondamentalement mieux compris.

Modification de la capacité de réparation par le GG-NER suite aux traitements chimiothérapeutiques

L'analyse de la capacité de réparation par le GG-NER des trois paires de lignées cellulaires ovariennes cancéreuses isolées de patientes pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie (voir figure 8) révèle que dans deux des trois paires de lignées cellulaires analysées, une augmentation importante de la capacité de réparation par le GG-NER en phase S est obtenue. De plus, dans le cas des lignées isolées de la patiente 3133, une augmentation importante de la capacité de réparation dans les phases G1 et G2 est aussi observée.

Ceci suggère que le traitement chimiothérapeutique entraîne la sélection d'une sous-population de cellules ayant une capacité de réparation par le GG-NER plus importante. On peut penser que ceci se déroule parce qu'elles sont plus résistantes aux agents à base de platine utilisés dans le traitement du cancer de l'ovaire, qui causent du dommage à l'ADN. Dans le cas de la paire isolée de la patiente 2295 dans laquelle aucun changement appréciable n'est observé, ceci pourrait être dû au développement d'une résistance au traitement par un autre procédé, par exemple par une modification du rythme de l'influx/efflux du cisplatine dans la cellule.

Il est aussi possible que le traitement induise des mutations-clé dans la cellule, entraînant une modification de sa capacité de réparation par le GG-NER et ultimement de meilleures chances de survie, menant à la propagation de ce trait.

Ceci suggère que l'inhibition de la réparation par le GG-NER en phase S pourrait être une approche thérapeutique intéressante afin de bloquer le développement de la résistance clinique aux agents à base de platine. Toutefois, une meilleure compréhension fondamentale de ce phénomène entre autres en identifiant les protéines régulant la réparation par le GG-NER en phase S est nécessaire pour découvrir des cibles pharmacologiques potentielles.

Corrélation entre la capacité de réparation par le GG-NER en phase S et la sensibilité au cisplatine ainsi que la sensibilité aux UVC et à la MMC

Un élément supplémentaire impliquant la capacité de réparation par le GG-NER en phase S dans la résistance au cisplatine, en plus de l'augmentation de cette capacité suite aux traitements chimiothérapeutiques, est qu'une corrélation entre la sensibilité au cisplatine et la capacité de réparation par le GG-NER en phase S est observée ($P=0,01$).

Ceci renforce la notion que la réparation par le GG-NER en phase S spécifiquement (et non en G1 et en G2) est cruciale dans la résistance au cisplatine. En effet, certaines lignées réparant pourtant relativement bien le dommage en G1 ou en G2 et ayant une réparation par le GG-NER en phase S déficiente montrent une très grande sensibilité au cisplatine, par exemple Tov21G ou Ov1946 (voir figure 9). Toutefois, il apparaît surprenant que la réparation de l'ADN par le GG-NER en phase S joue un rôle crucial dans la réponse au cisplatine. En effet, la majorité des cellules en culture d'une population donnée se trouvent en G1 ou en G2 à un moment précis. Ceci est aussi vrai au cours du traitement par le cisplatine. Il est donc surprenant que l'impact de la réparation par le GG-NER en phase S soit si important, les cellules en G1 ou en G2 au moment du traitement réparant théoriquement le dommage induit avant de procéder à la réplication de leur génome.

De plus, ceci pourrait éventuellement être exploité pour déterminer si une patiente est susceptible de répondre au traitement par les agents à base de platine. Les agents à base de platine entraînant des effets secondaires importants, une patiente ayant une haute probabilité de ne pas répondre au traitement pourrait choisir de ne pas y recourir.

Une relation similaire a été observée entre la capacité de réparation en phase S par le GG-NER et la sensibilité *in vitro* à la MMC (voir figure 10). Bien que la corrélation ne soit pas statistiquement significative, une tendance similaire est observée. En fait, la lignée Ov3331, qui montre une déficience importante dans la réparation en phase S par le GG-NER, a pourtant une résistance importante à la MMC ($IC_{50}=0,56$). Dû à cette lignée, la corrélation n'est pas statistiquement significative à 95% de certitude ($P=0.10$). Toutefois, si cette lignée est éliminée du calcul, la corrélation devient statistiquement significative à 95% de certitude ($P=0.02$).

Le lien entre la capacité de réparation du GG-NER en phase S et la sensibilité aux UVC est faible et non statistiquement significatif à 95% de certitude ($P=0,06$) (voir tableau III). Prenons par exemple Tov1369TR, qui provient de la même patiente que Ov1369(2) (mais a été isolée avant traitement chimiothérapeutique). Tov1369TR est déficiente en GG-NER en phase S et a un taux de survie par rapport au contrôle de 78,1% alors que Ov1369(2) (isolée suite au traitement chimiothérapeutique et ayant une réparation efficace en phase S) a un taux de survie de 93,5% par rapport au contrôle (à $5J/m^2$). Cela montre une faible augmentation de 17% du taux de survie de Tov1369TR. De plus, Tov1369TR montre une plus grande résistance au traitement à $15 J/m^2$ que Ov1369(2), ce qui pourrait

par contre être expliqué par un effet de pallier (c'est-à-dire qu'à partir d'une certaine dose un mécanisme de résistance donné, ici la réparation en phase S par le GG-NER, ne s'avère plus être un élément déterminant de la survie, par exemple parce qu'il est saturé et donc inefficace). Par ailleurs, l'augmentation de la sensibilité au cisplatine entre ces deux lignées est de 43% et de 280% pour la MMC. Tov1369TR réparant les 6-4PPs de façon efficace en G1 et en G2, une explication possible serait que dans le cas du traitement aux UVC seules les cellules en phase S soient plus sensibles. Dans le cas du cisplatine et de la MMC il s'agirait d'un taux beaucoup plus important des cellules que simplement celles en phase S.

De plus, si on élimine encore une fois Ov3331 du calcul, les lignées réparant les 6-4PPs en phase S du cycle cellulaire ne sont plus que 1,58 fois plus résistantes aux UVC à 5 J/m² que les lignées ne réparant pas les 6-4PPs en phase S du cycle cellulaire et la corrélation n'est pas statistiquement significative, même à 90% de certitude (P=0.15). Cette même opération permet, comme mentionné préalablement, d'obtenir une résistance moyenne de 4.53 fois plus importante pour les lignées réparant les 6-4PPs en phase S du cycle cellulaire pour la MMC (calculé à partir du IC50, P=0.02). Étonnamment, Ov3331 ne fait pas figure d'exception pour la sensibilité au cisplatine, la résistance moyenne étant 4.26 fois plus importante pour les lignées réparant efficacement les 6-4PPs en phase S du cycle cellulaire (P=0.01) en incluant Ov3331.

Ces observations suggèrent que la réparation des crosslinks induits par le cisplatine ou la MMC se fait par un processus différent des dommages induits par les UVC qui

pourrait impliquer davantage la phase S. Par exemple, il est peut-être nécessaire pour une détection optimale des crosslinks que la cellule réplique son ADN (et non pour la détection des 6-4PPs). Une seconde hypothèse pourrait être que certains types de crosslinks sont réparés préférentiellement en phase S et que c'est ce type de crosslinks qui pourrait entraîner la cytotoxicité dans les cellules dont le GG-NER est déficient en phase S. Lorsque la réparation par le GG-NER en phase S est inefficace, ces crosslinks pourraient éventuellement entraîner le blocage de la réplication et éventuellement l'induction de DSBs, qui sont très cytotoxiques (Hartlerode and Scully, 2009; Huertas, 2010). Ce type de crosslink pourrait bien être les ICLs, qui sont entre autres fortement induits par la MMC. Des observations qui renforcent cette hypothèse sont que les ICLs sont majoritairement réparés en phase S du cycle cellulaire (Akkari, Bateman et al., 2000). De plus, la structure des ICLs suite à l'incision nécessaire à leur réparation est similaire à la structure d'une fourche de réplication bloquée et entraîne une réponse similaire de la cellule (Sarkar, Davies et al., 2006; Lehmann, Niimi et al., 2007).

On peut extrapoler et suggérer que les cellules ayant une déficience de la réparation par le GG-NER en phase S ont de la difficulté à réparer les dommages aux fourches de réplication bloquées et pourraient par le fait même avoir de la difficulté à réparer les ICLs. Ceci serait vrai peu importe la phase du cycle cellulaire dans lequel elles se trouvent, puisque leur réparation entraîne (contrairement aux 6-4PPs) la formation d'une structure similaire à une fourche de réplication bloquée. Une autre observation supportant cette hypothèse est que lorsque la réplication est inhibée par l'aphidicoline, entraînant donc la

diminution importante du nombre de fourches de réplication bloquées, les cellules ayant un GG-NER déficient en phase S (Seckel et XP-V) ont une réparation plus efficace des 6-4PPs (Auclair, Rouget et al., 2010).

Induction similaire de γ H2AX dans les différentes lignées cellulaires cancéreuses ovariennes

Puisque la délétion d'ATR provoque la réduction de la capacité de réparation par le GG-NER en phase S des 6-4PPs, nous voulions déterminer si la signalisation par ATR est efficace dans les lignées testées. Tel que le montre la figure 12, toutes les lignées cellulaires cancéreuses ovariennes testées montrent une phosphorylation normale de γ H2AX suite à l'irradiation UVC. De plus, les cellules isolées d'un patient atteint du syndrome de Seckel ne montrant pas d'induction (ou très peu) dans ces conditions, cette induction est bel et bien dépendante d'ATR, et non d'ATM, du moins dans les premières 2 heures suivant l'irradiation.

Cependant, il est possible qu'une protéine mutée en aval d'ATR dans la cascade de réponse aux dommages à l'ADN cause la déficience du GG-NER en phase S dans les lignées étudiées, par exemple Chk1. D'autres protéines candidates pourraient être la polymérase η , qui provoque aussi une diminution de l'efficacité de réparation des 6-4PPs en phase S lorsque mutée, ou encore une protéine directement impliquée dans le NER, comme XPA ou XPC. Il est peu probable que la protéine p53 ait un rôle à jouer, puisque sa délétion ne modifie pas la réparation des 6-4PPs en phase S (Auclair, Rouget et al., 2008).

Une alternative intéressante serait que la réparation par recombinaison homologue soit déficiente (ce mécanisme étant surtout actif en phase S). En effet, la réparation des 6-4PPs au site de fourches de réplication bloquées peut entraîner la création de DSBs lors de

l'incision par le NER (Limoli, Giedzinski et al., 2002). Une cellule dont la recombinaison homologue serait déficiente pourrait difficilement réparer ces DSBs et donc la cellule aurait intérêt (un avantage sélectif) à ralentir le rythme d'incision des lésions pour diluer la réparation des DSBs dans le temps afin de permettre à d'autres mécanismes de réparation des DSBs de compenser, par exemple la réparation par jonction des terminaisons non-homologue (NHEJ).

Cependant, si le nombre de fourches de réplication bloquées est trop important, l'incision ralentie provoquerait éventuellement l'effondrement des fourches de réplication bloquées et donc la création de DSBs qui ne pourraient être réparés par la cellule (parce qu'en nombre trop important) qui entrerait en apoptose. Fait intéressant, ce modèle de contrôle de la rapidité d'incision par la cellule pourrait expliquer l'observation qu'une dose petite d'UVC restaure la réparation en phase S des CPDs dans des lignées déficientes dans leur réparation en phase S à une plus haute dose (Auclair, Rouget et al., 2008). Quant à la déficience dans la recombinaison homologue qui pourrait être à l'origine de la nécessité de diluer les incisions par le NER dans le temps, elle pourrait aussi expliquer partiellement la sensibilité aux ICLs, la HR étant impliquée dans leur réparation (voir figure 6).

Conclusion

Sur les 7 lignées cellulaires tumorales d'origine ovarienne testées, quatre ont montré une déficience importante en GG-NER en phase S (plus de 70% des 6-4PPs restant après une incubation de 6h post-traitement, voir figure 7). Ceci suggère que cette déficience est un phénomène relativement commun.

De plus, des trois paires de lignées provenant de la même patiente pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie, dans deux cas une augmentation importante de la capacité de réparation par le GG-NER en phase S a été observée, et dans l'une de ces paires une augmentation importante de cette capacité a aussi été observée en G1 et en G2 (voir figure 8).

Les lignées réparant bien en phase S se sont aussi avérées être relativement plus résistantes au cisplatine que celles réparant relativement moins bien ($P=0,01$). Toutefois, même si une tendance similaire a été observée, cette corrélation n'a pas été observée dans le cas de la mitomycine C puisque la lignée Ov3331, qui a une capacité de réparation relativement faible ($74 \pm 2\%$ des 6-4PPs restant après une incubation de 6h suite au traitement), a une résistance relativement élevée à la mitomycine C (voir table II). Ceci est vrai aussi pour la résistance aux UVC, qui a une tendance similaire à celle obtenue pour le cisplatine ou la MMC mais cette tendance n'est pas statistiquement significative. On observe cependant pour les UVC que généralement le ratio de la différence de sensibilité à

5 J/m² entre les lignées réparant les 6-4PPs en phase S et celles ne réparant pas les 6-4PPs en phase S est plus faible que pour le cisplatine.

Enfin, nous avons analysé la capacité de différentes lignées à phosphoryler l'histone H2AX par immunofluorescence en réponse à l'irradiation UVC (voir figure 12). Il faut rappeler ici qu'une délétion d'ATR entraîne une déficience dans la réparation par le GG-NER en phase S uniquement (Auclair, Rouget et al., 2008) et que H2AX est phosphorylée par ATR (Hanasoge and Ljungman, 2007). Puisque l'ensemble des lignées cellulaires testées, autant les lignées ayant une capacité de réparation relativement élevée du GG-NER en phase S que celles ayant une capacité relativement réduite, montrent une importante induction de γ H2AX, il est probable que la signalisation par ATR dans toutes ces lignées soit efficace.

Limites de l'étude

La limite principale de cette étude est l'échantillon réduit. Ainsi, toute lignée ayant des caractéristiques hors du commun a un impact important sur les conclusions de l'étude, par exemple Ov3331. De plus, l'échantillon réduit ne permet pas de tirer des conclusions avec une fiabilité suffisante pour envisager des tests cliniques.

Il faut aussi mentionner l'hétérogénéité génétique importante entre les diverses lignées cellulaires étudiées qui réduit la puissance de l'analyse. En effet, bien que les lignées aient été catégorisées en fonction de leurs capacités de réparation en phase S par le GG-NER, une foule d'autres différences existent entre ces diverses lignées qui pourraient expliquer les différences de sensibilité remarquées, par exemple l'influx/efflux des drogues dans ces lignées qui pourrait être totalement différent entre les diverses lignées, le contrôle de l'apoptose ou des points de contrôle du cycle cellulaire, etc.

De plus, nous n'avons pas déterminé si les résultats obtenus coïncident avec la réponse des patientes en clinique. En effet, la réponse de cellules *in vitro* peut être fort différente de la réponse d'une patiente en clinique. Il a d'ailleurs déjà été suggéré que les mécanismes de résistance *in vitro* et *in vivo* au cisplatine pourraient être fort différents (Teicher, Herman et al., 1990).

Une autre faiblesse importante est la controverse autour de la phosphorylation de γ H2AX qui, selon certaines études, dépendrait d'ATM et non d'ATR. Bien que des résultats dans notre laboratoire suggèrent qu'elle est dépendante d'ATR, il serait préférable

de mesurer la phosphorylation d'un deuxième substrat d'ATR pour éliminer tout doute, par exemple Chk1. Une amélioration à la technique utilisée serait de normaliser les signaux de fluorescence obtenus par rapport au DAPI afin d'obtenir des résultats plus facilement quantifiables. Une autre approche serait de réaliser cette expérience à nouveau par cytométrie de flux ou même par immunobuvardage.

Enfin, la variabilité dans la procédure d'irradiation entre les diverses expériences réalisées peut s'avérer un élément entraînant des différences significatives dans la réponse des cellules à l'irradiation puisque cette réponse (ainsi que la capacité de réparation des dommages induits) est dépendante de la dose.

Expériences futures

Afin de construire sur les résultats exposés dans ce mémoire, plusieurs expériences futures pourraient être réalisées. Entre autres, la vérification de la phosphorylation de Chk1, un substrat d'ATR, dans les diverses lignées pourrait s'avérer un contrôle fort intéressant afin de renforcer nos données suggérant que la kinase ATR est active dans toutes les lignées cellulaires utilisées dû à l'induction de γ H2AX.

La caractérisation plus approfondie des divers mécanismes cellulaires impliqués dans la réparation des ICLs dans ces lignées, entre autres la synthèse translésion et la HR, pourrait permettre de mieux comprendre l'implication, ou non, des ICLs dans la cytotoxicité dans ces lignées cellulaires. Entre autres, la présence de foci de Rad51, essentielle à la HR, pourrait être vérifiée par immunofluorescence suite à un traitement à la MMC, induisant la création d'ICLs et de DSBs. Quant à la synthèse translésion, étant donné que la délétion de la polymérase η provoque une déficience dans la réparation des 6-4PPs en phase S, les niveaux de cette protéine pourraient être vérifiés par Western Blot. Afin de vérifier si cette protéine est mutée, le séquençage de celle-ci sera aussi effectué.

D'autres impacts possibles de la réparation par le GG-NER en phase S pourraient être étudiés, dont le taux de mutation ou le vieillissement. L'accumulation de dommages à l'ADN ayant un lien avec le vieillissement, l'impact d'une déficience du GG-NER en phase S sur celle-ci pourrait être vérifié par l'essai associé à la sénescence de la β -Galactosidase à pH 6 en utilisant les lignées cancéreuses d'origine ovarienne. Les mutations étant souvent

provoquées par la réparation du dommage à l'ADN inefficace, le taux de mutation pourrait être évalué à l'aide de l'essai de mutation HPRT en comparant le taux de mutation suite à l'irradiation UVC des diverses lignées.

Enfin, il serait aussi intéressant de comparer les résultats obtenus avec la réponse clinique des patientes, afin peut-être de développer à terme un outil pronostique quant à la réponse au cisplatine chez les patientes atteintes du cancer de l'ovaire.

Bibliographie

- Aboussekhra, A. and R. D. Wood (1995).** Detection of Nucleotide Excision Repair Incisions in Human Fibroblasts by Immunostaining for PCNA. *Experimental Cell Research* **221**,2: 326-332.
- Abraham, R. T. (2001).** Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development* **15**,17: 2177-2196.
- Adimoolam, S. and J. M. Ford (2003).** p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair* **2**,9: 947-954.
- Aebi, S., B. Kurdi-Haidar, et al. (1996).** Loss of DNA Mismatch Repair in Acquired Resistance to Cisplatin. *Cancer Research* **56**,13: 3087-3090.
- Agarwal, R. and S. Kaye (2003).** Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **3**: 502-516.
- Akkari, Y. M. N., R. L. Bateman, et al. (2000).** DNA Replication Is Required To Elicit Cellular Responses to Psoralen-Induced DNA Interstrand Cross-Links. *Mol. Cell. Biol.* **20**,21: 8283-8289.
- Albertella, M. R., C. M. Green, et al. (2005).** A Role for Polymerase η in the Cellular Tolerance to Cisplatin-Induced Damage. *Cancer Research* **65**,21: 9799-9806.
- Amé, J.-C., C. Spenlehauer, et al. (2004).** The PARP superfamily. *Bioessays* **26**,8: 882-893.
- Andreassen, P. R., A. D. D'Andrea, et al. (2004).** ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes & Development* **18**,16: 1958-1963.
- Andrews, A., S. Barrett, et al. (1978).** Cockayne's syndrome fibroblasts have increased sensitivity to ultraviolet light but normal rates of unscheduled DNA synthesis. *Journal of Investigative Dermatology* **70**,5: 237-239.
- Appella, E. and C. W. Anderson (2001).** Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European Journal of Biochemistry* **268**,10: 2764-2772.
- Arata, Y., M. Fujita, et al. (2000).** Cdk2-dependent and -independent Pathways in E2F-mediated S Phase Induction. *Journal of Biological Chemistry* **275**:: 6337-6345.

- Araújo, S., F. Tirode, et al. (2000).** Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK *Genes & Development* **14**: 349-359.
- Auclair, Y., R. Rouget, et al. (2008).** ATR kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during S phase in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**,46: 17896-17901.
- Auclair, Y., R. Rouget, et al. (2010).** Requirement for functional DNA polymerase η in genome-wide repair of UV-induced DNA damage during S phase. *DNA Repair* **9**,7: 754-764.
- Auersperg, N., A. S. T. Wong, et al. (2001).** Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology. *Endocr Rev* **22**,2: 255-288.
- Banáth, J. P. and P. L. Olive (2003).** Expression of Phosphorylated Histone H2AX as a Surrogate of Cell Killing by Drugs That Create DNA Double-Strand Breaks. *Cancer Research* **63**,15: 4347-4350.
- Bartek, J., J. Bartkova, et al. (2007).** DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* **26**,56: 7773-7779.
- Bartek, J., J. Falck, et al. (2001).** Chk2 kinase [mdash] a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**,12: 877-886.
- Bartek, J. and J. Lukas (2003).** Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cell* **113**,5: 421-429.
- Bassett, E., N. M. King, et al. (2004).** The Role of DNA Polymerase η in Translesion Synthesis Past Platinum–DNA Adducts in Human Fibroblasts. *Cancer Research* **64**,18: 6469-6475.
- Bender, K., C. Blattner, et al. (1997).** UV-induced signal transduction. *Journal of photochemistry and photobiology* **37**: 1-17.
- Bender, K., M. Gottlicher, et al. (1998).** Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF- κ B by UV. *The EMBO Journal* **17**,17: 5170-5181.
- Bienko, M., C. M. Green, et al. (2005).** Ubiquitin-Binding Domains in Y-Family Polymerases Regulate Translesion Synthesis. *Science* **310**,5755: 1821-1824.

- Binks, S. P. and M. Dobrota (1990).** Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. *Biochemical Pharmacology* **40**,6: 1329-1336.
- Brown, E. J. and D. Baltimore (2000).** ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes & Development* **14**,4: 397-402.
- Brugarolas, J., C. Chandrasekaran, et al. (1995).** Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* **377**.
- Buermeier, A. B., S. M. Deschênes, et al. (1999).** Mammalian DNA mismatch repair. *Annual Review of Genetics* **33**,1: 533-564.
- Buscher, M., H. Rahmsdorf, et al. (1988).** Activation of the c-fos gene by UV and phorbol ester: different signal transduction pathways converge to the same enhancer element. *Oncogene* **3**: 301-311.
- Cara, A. R. and M. E. Dolan (2007).** Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer treatment reviews* **33**,1: 9-23.
- Carr, A. M. (2000).** Cell cycle - Piecing together the p53 puzzle. *Science* **287**,5459: 1765-1766.
- Chehab, N. H., A. Malikzay, et al. (2000).** Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53. *Genes & Development* **14**,3: 278-288.
- Chen, V. W., B. Ruiz, et al. (2003).** Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* **97**,S10: 2631-2642.
- Choi, J.-H., L. A. Lindsey-Boltz, et al. (2007).** Reconstitution of a human ATR-mediated checkpoint response to damaged DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**,33: 13301-13306.
- Choi, J.-H., L. A. Lindsey-Boltz, et al. (2009).** Cooperative activation of the ATR checkpoint kinase by TopBP1 and damaged DNA. *Nucl. Acids Res.* **37**,5: 1501-1509.
- Cimprich, K. A. and D. Cortez (2008).** ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**,8: 616-627.

- Cleaver, J. E. (1968).** Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* **218**,5142: 652-666.
- Cleaver, J. E. (1972).** Xeroderma pigmentosum: variants with normal DNA repair and normal sensitivity to ultraviolet light. *Invest Dermatol* **58**: 124-128.
- Cleaver, J. E. (2005).** Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* **5**,7: 564-573.
- Cleaver, J. E., E. T. Lam, et al. (2009).** Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet* **10**,11: 756-768.
- Coffer, P., B. Burgering, et al. (1995).** UV activation of receptor tyrosine kinase activity. *Oncogene* **11**,3: 561-569.
- Cortez, D., S. Guntuku, et al. (2001).** ATR and ATRIP: Partners in checkpoint signaling. *Science* **294**,5547: 1713-1716.
- Coverley, D., M. Kenny, et al. (1991).** Requirement for the replication protein SSB in human DNA excision repair. *Nature* **349**,6309: 538-541.
- Cui, Y. H., J. Konig, et al. (1999).** Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Molecular Pharmacology* **55**,5: 929-937.
- Cunningham, R. P. (1997).** DNA glycosylases. *Mutation Research-DNA Repair* **383**,3: 189-196.
- Dabholkar, M., K. Thornton, et al. (2000).** Increased mRNA levels of xeroderma pigmentosum complementation group B (XPB) and Cockayne's syndrome complementation group B (CSB) without increased mRNA levels of multidrug-resistance gene (MDR1) or metallothionein-II (MT-II) in platinum-resistant human ovarian cancer tissues. *Biochemical Pharmacology* **60**,11: 1611-1619.
- Dabholkar, M., J. Vionnet, et al. (1994).** Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *The Journal of Clinical Investigation* **94**,2: 703-708.
- Datta, S. R., A. Brunet, et al. (1999).** Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development* **13**,22: 2905-2927.

- Davies, S. L., P. S. North, et al. (2004).** Phosphorylation of the Bloom's syndrome helicase and its role in recovery from S-phase arrest. *Molecular and Cellular Biology* **24**,3: 1279-1291.
- de Feraudy, S., I. Revet, et al. (2010).** A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of γ H2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**,15: 6870-6875.
- de Laat, W. L., E. Appeldoorn, et al. (1998).** DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair. *Genes & Development* **12**,16: 2598-2609.
- Despierre, E., D. Lambrechts, et al. (2010).** The molecular genetic basis of ovarian cancer and its roadmap towards a better treatment. *Gynecologic Oncology* **117**,2: 358-365.
- Devary, Y., R. Gottlieb, et al. (1991).** Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2804-2811.
- DiTullio, R. A., T. A. Mochan, et al. (2002).** 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat Cell Biol* **4**,12: 998-1002.
- Dronkert, M. L. G. and R. Kanaar (2001).** Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation Research/DNA Repair* **486**,4: 217-247.
- Eastman, A. (1987).** The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacology & Therapeutics* **34**,2: 155-166.
- El-Khamisy, S. F., M. Masutani, et al. (2003).** A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research* **31**,19: 5526-5533.
- El-Khateeb, M., T. G. Appleton, et al. (1999).** Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. *Journal of Inorganic Biochemistry* **77**,1-2: 13-21.

- Evans, E., J. Fellows, et al. (1997).** Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein. *EMBO J* **16**,3: 625-638.
- Evans, E., J. G. Moggs, et al. (1997).** Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J* **16**,21: 6559-6573.
- Fanning, E., V. Klimovich, et al. (2006).** A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucl. Acids Res.* **34**,15: 4126-4137.
- Feijoo, C., C. Hall-Jackson, et al. (2001).** Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest. *The Journal of Cell Biology* **154**,5: 913-924.
- Ford, J. M. and P. C. Hanawalt (1995).** Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**,19: 8876-8880.
- Frank, T., S. Manley, et al. (1998).** Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J Clin Oncol* **16**: 2417-2425.
- Freeman, S., H. Hacham, et al. (1989).** Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**: 5605-5609.
- Friedberg, E. C. (2005).** Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**,12: 943-953.
- Friedberg, E. C., A. R. Lehmann, et al. (2005).** Trading places: How do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Molecular Cell* **18**,5: 499-505.
- Frohling, S. and H. Dohner (2008).** Chromosomal Abnormalities in Cancer. *N Engl J Med* **359**,7: 722-734.
- Fuertes, M. A., C. Alonso, et al. (2003).** Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance. *Chemical Reviews* **103**,3: 645-662.

- Furnari, B., N. Rhind, et al. (1997).** Cdc25 mitotic inducer targeted by Chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* **277**,5331: 1495-1497.
- Garinis, G. A., J. R. Mitchell, et al. (2005).** Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *EMBO J* **24**,22: 3952-3962.
- Gatei, M., K. Sloper, et al. (2003).** Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent Phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in Response to Ionizing Radiation. *Journal of Biological Chemistry* **278**:: 14806-14811.
- Giaccia, A. J. and M. B. Kastan (1998).** The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes & Development* **12**,19: 2973-2983.
- Gillet, L. C. J. and O. D. Schärer (2005).** Molecular Mechanisms of Mammalian Global Genome Nucleotide Excision Repair. *Chemical Reviews* **106**,2: 253-276.
- Guo, C., J. Kosarek-Stancel, et al. (2009).** Y-family DNA polymerases in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**,14: 2363-2381.
- Hammond, E. M., S. L. Green, et al. (2003).** Comparison of hypoxia-induced replication arrest with hydroxyurea and aphidicolin-induced arrest. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **532**,1-2: 205-213.
- Hanasoge, S. and M. Ljungman (2007).** H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis* **28**,11: 2298-2304.
- Harper, J. W. and S. J. Elledge (2007).** The DNA Damage Response: Ten Years After. **28**,5: 739-745.
- Hartlerode, A. J. and R. Scully (2009).** Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochemical Journal* **423**,2: 157-168.
- Hassepass, I., R. Voit, et al. (2003).** Phosphorylation at Serine 75 Is Required for UV-mediated Degradation of Human Cdc25A Phosphatase at the S-phase Checkpoint. *Journal of Biological Chemistry* **278**:: 29824-29829.

- Havener, J. M., S. A. Nick McElhinny, et al. (2003).** Translesion Synthesis Past Platinum DNA Adducts by Human DNA Polymerase γ . *Biochemistry* **42**,6: 1777-1788.
- Hayakawa, J., M. Ohmichi, et al. (1999).** Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade, differentially activated by cisplatin, sensitizes human ovarian cancer cell line. *Journal of Biological Chemistry* **274**,44: 31648-31654.
- Hermeking, H., C. Lengauer, et al. (1997).** 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular Cell* **1**,1: 3-11.
- Hirao, A., Y.-Y. Kong, et al. (2000).** DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2. *Science* **287**,5459: 1824-1827.
- Hoeijmakers, J. H. J. (2001).** Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**,6835: 366-374.
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009).** DNA Damage, Aging, and Cancer. *N Engl J Med* **361**,15: 1475-1485.
- Hoffman, R. M. (1991).** In vitro sensitivity assays in cancer: A review, analysis, and prognosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **5**,2: 133-143.
- Hoffmann, J. S., M. J. Pillaire, et al. (1995).** DNA polymerase beta bypasses in vitro a single d(GpG)-cisplatin adduct placed on codon 13 of the HRAS gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**,12: 5356-5360.
- Hofseth, L. J., S. P. Hussain, et al. (2004).** p53: 25 years after its discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* **25**,4: 177-181.
- Hollstein, M., K. Rice, et al. (1994).** Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell-lines. *Nucleic Acids Research* **22**,17: 3551-3555.
- Holschneider, C. H. and J. S. Berek (2000).** Ovarian cancer: Epidemiology, biology, and prognostic factors. *Seminars in Surgical Oncology* **19**,1: 3-10.
- Holzer, A. K., G. Samimi, et al. (2004).** The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Molecular Pharmacology* **66**,4: 817-823.

- Hopfner, K.-P., L. Craig, et al. (2002).** The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* **418**,6897: 562-566.
- Houtgraaf, J. H., J. Versmissen, et al. (2006).** A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular Revascularization Medicine* **7**,3: 165-172.
- Huang, X., M. Okafuji, et al. (2004).** Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry Part A* **58A**,2: 99-110.
- Huertas, P. (2010).** DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol* **17**,1: 11-16.
- Husain, A., G. S. He, et al. (1998).** BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Research* **58**,6: 1120-1123.
- Ishida, S., J. Lee, et al. (2002).** Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**,22: 14298-14302.
- Jackson, S. P. and J. Bartek (2009).** The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**,7267: 1071-1078.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008).** Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* **58**,2: 71-96.
- Jin, J., T. Shirogane, et al. (2003).** SCF β -TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes & Development* **17**,24: 3062-3074.
- Johnson, R. E., S. Prakash, et al. (1999).** Efficient Bypass of a Thymine-Thymine Dimer by Yeast DNA Polymerase, Pol. *Science* **283**,5404: 1001-1004.
- Jordan, M. A., K. Wendell, et al. (1996).** Mitotic Block Induced in HeLa Cells by Low Concentrations of Paclitaxel (Taxol) Results in Abnormal Mitotic Exit and Apoptotic Cell Death. *Cancer Research* **56**,4: 816-825.
- Kanamori, Y., J. Kigawa, et al. (1998).** A newly developed adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene increases sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II) in p53-deleted ovarian cancer cells. *European Journal of Cancer* **34**,11: 1802-1806.

- Kannouche, P. L., J. Wing, et al. (2004).** Interaction of Human DNA Polymerase [eta] with Monoubiquitinated PCNA: A Possible Mechanism for the Polymerase Switch in Response to DNA Damage. *Molecular Cell* **14**,4: 491-500.
- Kartalou, M. and J. M. Essigmann (2001).** Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **478**,1-2: 1-21.
- Kawanishi, S., Y. Hiraku, et al. (2006).** Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biological Chemistry* **387**,4: 365-372.
- Kelland, L. (1993).** New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol.* **15**,3: 191-219.
- Kigawa, J., S. Sato, et al. (2002).** Effect of p53 gene transfer and cisplatin in a peritonitis carcinomatosa model with p53-deficient ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology* **84**,2: 210-215.
- Kim, J.-K. and B.-S. Choi (1995).** The Solution Structure of DNA Duplex-Decamer Containing the (6-4) Photoproduct of Thymidylyl(3'→5')Thymidine by NMR and Relaxation Matrix Refinement. *European Journal of Biochemistry* **228**,3: 849-854.
- Kirkwood, T. B. L. (2005).** Understanding the Odd Science of Aging. **120**,4: 437-447.
- Klocker, H., B. Auer, et al. (1984).** A synthetic hapten for induction of thymine-dimer specific-antibodies. *European Journal of Biochemistry* **142**: 313-316.
- Koehler, D., J. Courcelle, et al. (1996).** Kinetics of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproduct repair in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **178**,5: 1347-1350.
- Komatsu, M., T. Sumizawa, et al. (2000).** Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Research* **60**,5: 1312-1316.
- Kool, M., M. deHaas, et al. (1997).** Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Research* **57**,16: 3537-3547.

- Kumaresan, K. R., M. Hwang, et al. (2001).** Contribution of XPF Functional Domains to the 5' and 3' Incisions Produced at the Site of a Psoralen Interstrand Cross-Link†. *Biochemistry* **41**,3: 890-896.
- Kunkel, T. A., Y. I. Pavlov, et al. (2003).** Functions of human DNA polymerases [eta], [kappa] and [iota] suggested by their properties, including fidelity with undamaged DNA templates. *DNA Repair* **2**,2: 135-149.
- Lawley, P. and D. Phillips (1996).** DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutation Research* **355**,1-2: 13-40.
- Lee, C.-H. and J. H. Chung (2001).** The hCds1 (Chk2)-FHA Domain Is Essential for a Chain of Phosphorylation Events on hCds1 That Is Induced by Ionizing Radiation. *Journal of Biological Chemistry* **276**:: 30537-30541.
- Lehmann, A. (2001).** The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases *Genes & Development* **15**: 15-23.
- Lehmann, A. R., A. Niimi, et al. (2007).** Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair* **6**,7: 891-899.
- Lewis, A. D., J. D. Hayes, et al. (1988).** Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis* **9**,7: 1283-1287.
- Lieber, M. R., Y. Ma, et al. (2003).** Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**,9: 712-720.
- Limoli, C. L., E. Giedzinski, et al. (2002).** UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, γ -H2AX formation, and Mre11 relocalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**,1: 233-238.
- Lindahl, T. (1993).** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709-715.
- Lindahl, T. and R. D. Wood (1999).** Quality Control by DNA Repair. *Science* **286**,5446: 1897-1905.

- Liu, J.-S., S.-R. Kuo, et al. (2003).** Comparison of checkpoint responses triggered by DNA polymerase inhibition versus DNA damaging agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **532**,1-2: 215-226.
- Liu, Q., S. Guntuku, et al. (2000).** Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes & Development* **14**,12: 1448-1459.
- Liu, Q. H., S. Guntuku, et al. (2000).** Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes & Development* **14**,12: 1448-1459.
- Losa, J. H., C. P. Cobo, et al. (2003).** Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy. *Oncogene* **22**,26: 3998-4006.
- Madronich, S. (1993).** The atmosphere and UV-B radiation at ground level in A. Young, L. Bjorn, J. Moan and W. Nultsch. *Environmental UV Photobiology*: 1-39.
- Mann, S. C., P. A. Andrews, et al. (1991).** Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation and sensitivity by forskolin and 3-isobutyl-1-methylxanthine in sensitive and resistant human ovarian-carcinoma cells. *International Journal of Cancer* **48**,6: 866-872.
- Mansouri, A., L. D. Ridgway, et al. (2003).** Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**,21: 19245-19256.
- Massey, A., J. Offman, et al. (2003).** DNA mismatch repair and acquired cisplatin resistance in E. coli and human ovarian carcinoma cells. *DNA Repair* **2**,1: 73-89.
- Masson, M., C. Niedergang, et al. (1998).** XRCC1 Is Specifically Associated with Poly(ADP-Ribose) Polymerase and Negatively Regulates Its Activity following DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* **18**,6: 3563-3571.
- Mathonnet, G., C. Léger, et al. (2003).** UV wavelength-dependent regulation of transcription-coupled nucleotide excision repair in p53-deficient human cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**,12: 7219-7224.

- Matsunaga, T., D. Mu, et al. (1995).** Human DNA repair excision nuclease analysis of the roles of the subunits involved in dual incisions by using anti-XPG and anti-ERCC1 antibodies. *The Journal of Biological chemistry* **270**: 20862-20869.
- Matsuoka, S., B. A. Ballif, et al. (2007).** ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science* **316**,5828: 1160-1166.
- McGregor, W. G., R. H. Chen, et al. (1991).** Cell cycle-dependent strand bias for UV-induced mutations in the transcribed strand of excision repair-proficient human fibroblasts but not in repair-deficient cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**,4: 1927-1934.
- Meek, D. W. (1999).** Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene* **18**,53: 7666-7675.
- Meek, D. W. (2004).** The p53 response to DNA damage. *DNA Repair* **3**,8-9: 1049-1056.
- Mellon, I., G. Spivak, et al. (1987).** Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene *Cell* **51**,2: 241-249.
- Meyer, J., C. Willett, et al. (2010).** Current and Emerging Treatment Strategies for Anal Cancer. *Current Oncology Reports* **12**,3: 168-174.
- Mike, D. S., D. M. Malcolm, et al. (2010).** Intravesical therapy for superficial bladder cancer: A systematic review of randomised trials and meta-analyses. *Cancer treatment reviews* **36**,3: 195-205.
- Mitchell, D. L. (1988).** The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochemistry and Photobiology* **48**,1: 51-57.
- Moggs, J. G., K. J. Yarema, et al. (1996).** Analysis of Incision Sites Produced by Human Cell Extracts and Purified Proteins during Nucleotide Excision Repair of a 1,3-Intrastrand d(GpTpG)-Cisplatin Adduct *The Journal of Biological chemistry* **271**: 7177-7186.

- Momand, J., H. H. Wu, et al. (2000).** MDM2 - master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* **242**,1-2: 15-29.
- Moore, M. H., J. M. Gulbis, et al. (1994).** Crystal-structure of a suicidal DNA-repair protein- The ADA O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase from Escherichia Coli. *Embo Journal* **13**,7: 1495-1501.
- Naegeli, H. (1994).** Roadblocks and detours during DNA replication: mechanisms of mutagenesis in mammalian cells. *Bioessays* **16**,8: 557-564.
- Nakayama, K., A. Kanzaki, et al. (2004).** Prognostic value of the Cu-transporting ATPase in ovarian carcinoma patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Clinical Cancer Research* **10**,8: 2804-2811.
- Noll, D. M., T. M. Mason, et al. (2005).** Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. *Chemical Reviews* **106**,2: 277-301.
- Noll, D. M., T. M. Mason, et al. (2006).** Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chemical Reviews* **106**,2: 277-301.
- O'Driscoll, M., V. L. Ruiz-Perez, et al. (2003).** A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* **33**,4: 497-501.
- Offer, H., R. Wolkowicz, et al. (1999).** Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Letters* **450**,3: 197-204.
- Ohnishi, T., E. Mori, et al. (2009).** DNA double-strand breaks: Their production, recognition, and repair in eukaryotes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **669**,1-2: 8-12.
- Okano, S., L. Lan, et al. (2003).** Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Molecular and Cellular Biology* **23**,11: 3974-3981.
- Olaussen, K. A., A. Dunant, et al. (2006).** DNA Repair by ERCC1 in Non-Small-Cell Lung Cancer and Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. *New England Journal of Medicine* **355**,10: 983-991.

- Oliver, T. G., K. L. Mercer, et al. (2010).** Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Genes & Development* **24**,8: 837-852.
- Ormerod, M. G., C. F. O'Neill, et al. (1994).** Cisplatin Induces Apoptosis in a Human Ovarian Carcinoma Cell Line without Concomitant Internucleosomal Degradation of DNA. *Experimental Cell Research* **211**,2: 231-237.
- Ozols, R. (2005).** Treatment goals in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* **15**: 3-11.
- Palom, Y., G. Suresh Kumar, et al. (2002).** Relative Toxicities of DNA Cross-Links and Monoadducts: New Insights from Studies of Decarbamoyl Mitomycin C and Mitomycin C. *Chemical Research in Toxicology* **15**,11: 1398-1406.
- Patrick, S. M. and J. J. Turchi (2002).** Xeroderma Pigmentosum Complementation Group A Protein (XPA) Modulates RPA-DNA Interactions via Enhanced Complex Stability and Inhibition of Strand Separation Activity. *The Journal of Biological chemistry* **277**: 16096-16101.
- Pellegrini, L., D. S. Yu, et al. (2002).** Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* **420**,6913: 287-293.
- Permeth-Wey, J. and T. A. Sellers (2009). Epidemiology of Ovarian Cancer: 413-437.
- Pichierri, P. and F. Rosselli (2004).** Fanconi Anemia Proteins and the S Phase Checkpoint. *Cell Cycle* **3**,6: 696-698.
- Pichierri, P., F. Rosselli, et al. (2003).** Werner's syndrome protein is phosphorylated in an ATR/ATM-dependent manner following replication arrest and DNA damage induced during the S phase of the cell cycle. *Oncogene* **22**,10: 1491-1500.
- Plosky, B. S., A. E. Vidal, et al. (2006).** Controlling the subcellular localization of DNA polymerases [iota] and [eta] via interactions with ubiquitin. *EMBO J* **25**,12: 2847-2855.
- Prakash, S., R. E. Johnson, et al. (2005).** Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: Specificity of structure and function. *Annual Review of Biochemistry* **74**: 317-353.

- Rajski, S. R. and R. M. Williams (1998).** DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. *Chemical Reviews* **98**,8: 2723-2796.
- Rass, E., A. Grabarz, et al. (2009).** Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* **16**,8: 819-824.
- Reinhardt, H. and M. Yaffe (2009).** Kinases that Control the Cell Cycle in Response to DNA Damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current Opinion in Cell Biology* **21**,2: 245-255.
- Renwick, A., D. Thompson, et al. (2006).** ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* **38**,8: 873-875.
- Riedl, T., F. Hanaoka, et al. (2003).** The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J* **22**,19: 5293-5303.
- Rosette, C. and M. Karin (1996).** Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* **274**: 1194-1197.
- Rouget, R., Y. Auclair, et al. (2008).** A Sensitive Flow Cytometry-based Nucleotide Excision Repair Assay Unexpectedly Reveals That Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Does Not Regulate the Removal of UV-induced DNA Damage in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry* **283**,9: 5533-5541.
- Saldivar, J. S., X. Wu, et al. (2007).** Nucleotide excision repair pathway review I: Implications in ovarian cancer and platinum sensitivity. *Gynecologic Oncology* **107**,1, Supplement 1: S56-S71.
- San, F. J., P. Chi, et al. (2006).** Recombination mediator and Rad51 targeting activities of a human BRCA2 polypeptide. *The Journal of Biological chemistry* **281**,17: 11649-11657.
- Sancar, A., L. A. Lindsey-Boltz, et al. (2004).** Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* **73**,1: 39-85.

- Sanchez, Y., C. Wong, et al. (1997).** Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: Linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277**,5331: 1497-1501.
- Sarkar, S., A. A. Davies, et al. (2006).** DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase [zeta]. *EMBO J* **25**,6: 1285-1294.
- Schärer, O. D. (2003).** Chemistry and Biology of DNA Repair. *Angewandte Chemie International Edition* **42**,26: 2946-2974.
- Schiff, P., J. Fant, et al. (1979).** Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**: 665-667.
- Schumacher, B., G. A. Garinis, et al. (2008).** Age to survive: DNA damage and aging. *Trends in Genetics* **24**,2: 77-85.
- Schumacher, B., I. van der Pluijm, et al. (2008).** Delayed and Accelerated Aging Share Common Longevity Assurance Mechanisms. *PLoS Genet* **4**,8: e1000161.
- Scully, R., R. Young, et al. (1998).** Tumors of the ovary, fallopian tube, and broad ligament. *Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology 3rd series, Fascicle 23.*
- Shechter, D., V. Costanzo, et al. (2004).** Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair* **3**,8-9: 901-908.
- Shen, X., H. Do, et al. (2009).** Recruitment of Fanconi Anemia and Breast Cancer Proteins to DNA Damage Sites Is Differentially Governed by Replication. *Molecular Cell* **35**,5: 716-723.
- Sherr, C. J. and J. D. Weber (2000).** The ARF/p53 pathway. *Current Opinion in Genetics & Development* **10**,1: 94-99.
- Shieh, S.-Y., J. Ahn, et al. (2000).** The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes & Development* **14**,3: 289-300.
- Shiloh, Y. (2003).** ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**,3: 155-168.

- Shivji, M., V. Podust, et al. (1995).** Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry* **34**,15: 5011-5017.
- Sinha, R. H. D. (2002).** UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* **1**(4): 225-236.
- Sixma, T. K. (2001).** DNA mismatch repair: MutS structures bound to mismatches. *Current Opinion in Structural Biology* **11**,1: 47-52.
- Smits, V. A. J., P. M. Reaper, et al. (2006).** Rapid PIKK-Dependent Release of Chk1 from Chromatin Promotes the DNA-Damage Checkpoint Response. **16**,2: 150-159.
- Smolka, M. B., C. P. Albuquerque, et al. (2007).** Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**,25: 10364-10369.
- Socinski, M. A. (2004).** Cytotoxic Chemotherapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* **10**,12: 4210s-4214s.
- Solomon, D. A., M. C. Cardoso, et al. (2004).** Dynamic targeting of the replication machinery to sites of DNA damage. *The Journal of Cell Biology* **166**,4: 455-463.
- Sorenson, C. M. and A. Eastman (1988).** Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA-synthesis and cell-cycle progression in excision repair proficient and deficient chinese-hamster ovary cells. *Cancer Research* **48**,23: 6703-6707.
- St. Clair, S. and J. Manfredi (2006).** The Dual Specificity Phosphatase Cdc25C is a Direct Target for Transcriptional Repression by the Tumor Suppressor p53. *Cell Cycle* **5**,7: 709-713.
- Stefanini, M., E. Botta, et al. (2010).** Trichothiodystrophy: From basic mechanisms to clinical implications. *DNA Repair* **9**,1: 2-10.
- Stewart, G. S., B. Wang, et al. (2003).** MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* **421**,6926: 961-966.
- Stojic, L., R. Brun, et al. (2004).** Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair* **3**,8-9: 1091-1101.

- Sung, P. and H. Klein (2006).** Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**,10: 739-750.
- Svejstrup, J. Q. (2002).** Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**,1: 21-29.
- Swift, M., P. J. Reitnauer, et al. (1987).** Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *New England Journal of Medicine* **316**,21: 1289-1294.
- Szabo, C. and M. King (1997).** Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* **60**: 1013-1020.
- Tapias, A., J. Auriol, et al. (2004).** Ordered Conformational Changes in Damaged DNA Induced by Nucleotide Excision Repair Factors. *The Journal of Biological chemistry* **279**: 19074-19083.
- Taylor, R. M., A. Thistlethwaite, et al. (2002).** Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology* **22**,8: 2556-2563.
- Teicher, B., T. Herman, et al. (1990).** Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo. *Science* **247**,4949: 1457-1461.
- Tibbetts, R. S., D. Cortez, et al. (2000).** Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes & Development* **14**,23: 2989-3002.
- Tomasz, M. and R. Lipman (1981).** Reductive metabolism and alkylating activity of mitomycin C induced by rat liver microsomes. *Biochemistry* **20**,17: 5056-5061.
- Tomasz, M. and Y. Palom (1997).** The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacology & Therapeutics* **76**,1-3: 73-87.
- Tornaletti, S. and P. Hanawalt (1999).** Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie* **81**,1-2: 139-146.
- Ünsal-Kaçmaz, K., A. M. Makhov, et al. (2002).** Preferential binding of ATR protein to UV-damaged DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**,10: 6673-6678.

- Vaisman, A., C. Masutani, et al. (2000).** Efficient Translesion Replication Past Oxaliplatin and Cisplatin GpG Adducts by Human DNA Polymerase η . *Biochemistry* **39**,16: 4575-4580.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **160**,1: 1-40.
- van de Ven, M., J.-O. Andressoo, et al. (2006).** Adaptive Stress Response in Segmental Progeria Resembles Long-Lived Dwarfism and Calorie Restriction in Mice. *PLoS Genet* **2**,12: e192.
- van Hoffen, A., A. T. Natarajan, et al. (1993).** Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells. *Nucl. Acids Res.* **21**,25: 5890-5895.
- van Hoffen, A., J. Venema, et al. (1995).** Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *The EMBO Journal* **14**,2: 360-367.
- Vasquez, K. M. (2010).** Targeting and processing of site-specific DNA interstrand crosslinks. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **51**,6: 527-539.
- Venema, J., L. Mullenders, et al. (1990).** The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**,12: 4707-4711.
- Vilenchik, M. M. and A. G. Knudson (2003).** Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**,22: 12871-12876.
- Vogelstein, B., D. Lane, et al. (2000).** Surfing the p53 network. *Nature* **408**,6810: 307-310.
- Volker, M. M., Martijn J; Karmakar, Parimal; van Hoffen, Anneke; Schul, Wouter; Vermeulen, Wim; Hoeijmakers, Jan H.J; van Driel, Roel; van Zeeland, Albert A; Mullenders, Leon H.F (2001).** Sequential Assembly of the Nucleotide Excision Repair Factors In Vivo. *Molecular Cell* **8**,1: 213-224.

- Vousden, K. H. and X. Lu (2002).** Live or let die: The cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer* **2**,8: 594-604.
- Wang, B., S. Matsuoka, et al. (2002).** 53BP1, a Mediator of the DNA Damage Checkpoint. *Science* **298**,5597: 1435-1438.
- Wang, D. and S. J. Lippard (2005).** Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* **4**,4: 307-320.
- Wang, X. and A. D. D'Andrea (2004).** The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair* **3**,8-9: 1063-1069.
- Wang, Y., D. Cortez, et al. (2000).** BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes & Development* **14**,8: 927-939.
- Wang, Y., R. Woodgate, et al. (2007).** Evidence that in Xeroderma Pigmentosum Variant Cells, which Lack DNA Polymerase η , DNA Polymerase ι Causes the Very High Frequency and Unique Spectrum of UV-Induced Mutations. *Cancer Research* **67**,7: 3018-3026.
- Ward, I. and J. Chen (2001).** Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress. *The Journal of Biological chemistry* **276**: 47759-47762.
- Ward, I. M., K. Minn, et al. (2004).** UV-induced Ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) Activation Requires Replication Stress. *Journal of Biological Chemistry* **279**:: 9677-9680.
- Ward, J. (1988).** DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **35**: 99-125.
- Watanabe, K., S. Tateishi, et al. (2004).** Rad18 guides pol[η] to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *EMBO J* **23**,19: 3886-3896.
- Welsh, C., R. Day, et al. (2004).** Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *International Journal of Cancer* **110**,3: 352-361.

- Williams, R. S., G. Moncalian, et al. (2008).** Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair. *Cell* **135**,1: 97-109.
- Wilson III, D. M., V. A. Bohr, et al. (2008).** DNA damage, DNA repair, ageing and age-related disease. *Mechanisms of Ageing and Development* **129**,7-8: 349-352.
- Wong, A., R. Pero, et al. (1997).** RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *The Journal of Biological chemistry* **272**,51: 31941-31944.
- Wu, X., S. M. Shell, et al. (2006).** ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation. *Oncogene* **26**,5: 757-764.
- Xie, A., A. Kwok, et al. (2009).** Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat Struct Mol Biol* **16**,8: 814-818.
- Yancik, R. (1993).** Ovarian cancer. Age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality. *Cancer* **71**: 517-523.
- Yaneva, M., T. Kowalewski, et al. (1997).** Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J* **16**,16: 5098-5112.
- Yokoi, M., C. Masutani, et al. (2000).** The Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex XPC-HR23B Plays an Important Role in the Recruitment of Transcription Factor IIH to Damaged DNA. *The Journal of Biological chemistry* **275**: 9870-9875.
- Yun, M. H. and K. Hiom (2009).** CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* **459**,7245: 460-463.
- Yunmei, M., U. Pannicke, et al. (2002).** Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination. *Cell* **108**,6: 781-794.
- Zamble, D. B., D. Mu, et al. (1996).** Repair of Cisplatin-DNA Adducts by the Mammalian Excision Nuclease†. *Biochemistry* **35**,31: 10004-10013.

- Zdzienicka, M., J. Venema, et al. (1992).** (6-4) photoproducts and not cyclobutane pyrimidine dimers are the main UV-induced mutagenic lesions in Chinese hamster cells. *Mutation Research* **273**,1: 73-83.
- Zeng, X.-R. J., Y.; Zhang, S.-J.; Hao, H.; Lee, M. Y. W. T. (1994).** DNA polymerase delta is involved in the cellular response to UV damage in human cells. *The Journal of Biological chemistry* **269**,19: 13748-13751.
- Zhang, N., X. Liu, et al. (2007).** Double-strand breaks induce homologous recombinational repair of interstrand cross-links via cooperation of MSH2, ERCC1-XPF, REV3, and the Fanconi anemia pathway. *DNA Repair* **6**,11: 1670-1678.
- Zhao, H. and H. Piwnica-Worms (2001).** ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1. *Mol. Cell. Biol.* **21**,13: 4129-4139.
- Zhao, J., A. Jain, et al. (2009).** Mismatch repair and nucleotide excision repair proteins cooperate in the recognition of DNA interstrand crosslinks. *Nucl. Acids Res.* **37**,13: 4420-4429.
- Zheng, H., X. Wang, et al. (2003).** Nucleotide Excision Repair- and Polymerase {eta}-Mediated Error-Prone Removal of Mitomycin C Interstrand Cross-Links. *Mol. Cell. Biol.* **23**,2: 754-761.
- Zou, L. and S. J. Elledge (2003).** Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* **300**,5625: 1542-1548.

Annexe 1

Lignée cellulaire	Histotype	Statut de p53	Pré/post chimiothérapie	Isolé de la tumeur ou de l'ascite	Paires de lignées d'une même patiente
TOV2223G	Séreux ¹	Muté(non fonctionnel) ¹	Pré-chimiothérapie	Tumeur	-
OV1946	Séreux ¹	Muté(non fonctionnel) ¹	Pré-chimiothérapie	Ascite	-
TOV21G	Cellules claires ²	WT ²	Pré-chimiothérapie	Tumeur	-
OV90	Adénocarcinome ²	Muté ²	Pré-chimiothérapie	Ascite	-
TOV1369TR	Séreux*	-	Pré-chimiothérapie	Tumeur	Paire 1
OV1369(2)	Séreux*	-	Post-chimiothérapie	Ascite	Paire 1
OV2295	Séreux*	-	Post-chimiothérapie	Ascite	Paire 3
TOV2295	Séreux*	-	Pré-chimiothérapie	Tumeur	Paire 3
TOV2835EP	Séreux*	-	Post-chimiothérapie	Tumeur	-
TOV3133G	Séreux*	-	Pré-chimiothérapie	Tumeur	Paire 2
OV3133	Séreux*	-	Post-chimiothérapie	Ascite	Paire 2
OV3331	Séreux*	-	Post-chimiothérapie	Ascite	-
OV866(2)	Séreux*	-	Post-chimiothérapie	Ascite	-

¹ Ouellet, V., M. Zietarska, et al. (2008). "Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines." *BMC Cancer* **8**(1): 152.

² Provencher, D., H. Lounis, et al. (2000). "CHARACTERIZATION OF FOUR NOVEL EPITHELIAL OVARIAN CANCER CELL LINES." *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Animal* **36**: 357-361.

*Caractérisation en cours, résultat préliminaire

